

Vol XVII, No. 3

May, 1933

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

TOKYO

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,

11 Itchome Kagacho, Ushigome.

Price: \$ 5.50 per volume.

SUR LE POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION DE LA RÉTINE.

Par

MINORU NAKASHIMA,

(Clinique ophtalmologique de la Faculté de Kanazawa, Kanazawa)

et

KATSUZÔ HAYASHI,

*(Clinique ophtalmologique de la Faculté de Nagoya. Directeur:
Prof. Ch. Oguchi)*

(Reçu pour la publication, le 9 Février 1933)

En examinant les réactions de la rétine elle-même ou de son extrait sous l'action de la lumière nous avons constaté les faits suivants: 1° Soumise à une illumination, la rétine produit du phosphate; 2° L'extrait de rétine accélère la photoréduction de l'hémoglobine, de l'argent, des sels de cuivre, etc.

L'origine de ces phénomènes est, de nos jours, la question qui se pose. Il y a naturellement de nombreuses façons de la résoudre; mais si l'on tient compte de l'action physiologique de la lumière, considérée, jusqu'à présent, comme action accélératrice de la réduction lumineuse, on peut penser que les phénomènes provenant des radiations ne sont autres qu'une oxydation ou une réduction. C'est pourquoi, sous la direction de M. Kodama, Professeur de bio-chimie à l'Aichi-Université de Nagoya, nous avons tenté de mesurer le potentiel d'oxydo-réduction de la rétine et de son extrait et d'observer aussi si la réaction s'effectuant sur la rétine sous l'action de la lumière est en effet une oxydation ou une réduction.

I. SUR LE POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION.

Dans le cas où il existe un système réversible d'oxydo-réduction, son potentiel chimique est généralement déterminé par la substance oxydée ou réduite qui se trouve dans ce milieu. Cette

relation est nettement montrée par la formule de Peters :

$$E = E_0 - \frac{R T}{n F} \ln \left(\frac{Red}{Ox} \right)$$

dans laquelle E représente le potentiel chimique, E_0 la constante de ce potentiel, R est la constante du gaz et a la valeur de 83157720 ergs = 8.313 joules (ou volt coulomb), T est la température absolue, n signifie le nombre des électrons au moment de sa réaction chimique, enfin F est le farad, unité de l'électricité statique : 96540 coulombs.

Toutes ces marques R , T , n , F et E_0 sont les constantes dans une formule chimique. Par conséquent, ce qui détermine la valeur de E , c'est la proportion de la réduction avec l'oxydation.

Comme on le voit nettement dans la formule ci-dessus mentionnée, la valeur de E augmente avec l'élévation de l'oxydation et diminue avec l'intensité de la réduction ; cela veut dire qu'une réduction s'effectue quand le potentiel chimique diminue et qu'une oxydation se manifeste quand il augmente.

Il faut d'abord remarquer ces deux mots ; Oxydation et Réduction. D'après ce que nous entendons habituellement par là, l'oxydation est une action combinant l'oxygène avec un corps composé ou privant celui-ci de son hydrogène, tandis que la réduction est celle qui enlève l'oxygène à un corps composé ou qui ajoute de l'hydrogène à ce dernier. Or, c'est là un cas d'oxydation ou de réduction exprimé dans le sens étroit des termes, et il diffère un peu du cas pris dans le sens général ; dans ce dernier cas, on considère, comme oxydation, le phénomène où les électrons se libèrent d'un corps composé et, comme réduction, celui où ils s'y adjoignent.

Par exemple, c'est une oxydation qui se réalise, quand dépourvu d'un des électrons $Fe^{..}$ se transforme en $Fe^{...}$; par contre, c'est une réduction qui se manifeste, lorsque $Fe^{...}$ se transforme $Fe^{..}$. De même, c'est une réduction qui se présente, quand l'ion H^+ se transforme en gaz H_2 , et c'est une oxydation dans le cas inverse.

Le potentiel d'oxydo-réduction faisant l'objet de notre description se base naturellement sur l'oxydo-réduction du sens général

et non du sens étroit. Oxydation signifie donc libération des électrons, et réduction leur adjonction.

II. SUBSTANCES ET PROCÉDÉ D'ÉPREUVE.

A. Substances utilisées.

Comme matières d'expérience, nous avons employé: (1°) la rétine fraîche de grenouille mise en suspension dans l'eau salée physiologique; (2°) la rétine fraîche de grenouille mise en suspension dans le liquide de Ringer (destiné à l'épreuve des animaux à sang froid); (3°) l'extrait de rétine de grenouille. Cet extrait est préparé avec une solution d'acide cholalique de soude à 4 p. 100 suivant le procédé de Sugita.

B. Procédé d'épreuve.

La matière a été éclairée par une lampe au tungstène à 50 W. à une distance de 16 cm. et filtrée par l'eau. Le tube à essai a été mis dans une chambre noire tenue à la température constante. Nous avons eu recours au potentiomètre pour la détermination du potentiel d'oxydo-réduction.

III. RÉSULTATS D'EXPÉRIENCE.

Les résultats obtenus par le procédé précédent sont résumés comme suit:—

I. Potentiel au début de la détermination.

Le potentiel de la rétine ou de son extrait semble varier selon les circonstances suivantes: (1°) la situation de la rétine dans l'obscurité. Quand elle est mise dans l'obscurité, son potentiel est faible dans le cas contraire il est fort. Le potentiel varie non seulement d'après la situation de l'organisme dans l'obscurité, mais encore d'après la durée de séjour dans l'obscurité de la solution avec la suspension ou l'extrait de rétine; (2°) la concentration des ions-hydrogène dans la solution. Il est tout naturel qu'elle joue un rôle important, au point de vue de potentiel d'oxydo réduction; (3°) la concentration de la solution elle-même. Lorsque cette solu-

tion est mise dans l'obscurité, son potentiel est d'autant plus faible qu'elle est plus concentrée.

Cependant, ce que nous voulons examiner surtout, c'est le changement de son potentiel manifesté au moment où la solution est exposée à la lumière et non son potentiel primitif. Pour cette raison, nous n'avons donné à la valeur de ce potentiel aucune attention étant donné surtout que ce potentiel initial n'influe pas beaucoup sur le potentiel de la solution soumise à la lumière, qui faisait l'objet de notre étude. Mais, il nous semble que la valeur approximative du potentiel primitif oscille autour de 0.1 volt dans une solution d'extrait contenant généralement cinq rétines de grenouille par 1 cmc. de solution.

II. Changement de potentiel au moment de l'éclairage.

Le changement de potentiel qui se produit au moment de l'éclairage de la solution de rétines mises en suspension ou de leurs extraits ainsi préparés, se trouve d'accord dans tous les cas: le potentiel monte subitement, se stabilise généralement au bout de 3 à 5 minutes et se maintient presque à une valeur fixe. Lorsqu'on soumet la matière à l'obscurité en la privant de lumière, le potentiel descend d'abord rapidement, ensuite lentement et s'approche enfin du potentiel primitif, mais sans l'atteindre. Quand elle est soumise à une nouvelle illumination, le potentiel remonte mais redescend dans l'obscurité.

Pour simplifier la comparaison du degré d'élévation avec le degré d'abaissement, dE indique le changement de potentiel calculé dans le cas où une seule rétine est contenue dans 1 cmc. de solution. Nous employons ce signe, E indiquant généralement le potentiel et d le changement. D'autre part, pour distinguer le temps d'exposition à la lumière et la durée du séjour à l'obscurité, nous nous servons des signes dE^l et dE^o .

Par exemple, la solution où quinze rétines sont mises en suspension dans 5 cmc. d'eau salée physiologique ou dans le liquide de Ringer a un potentiel variant entre 30 et 35 mv. Par conséquent, quand il n'y a qu'une seule rétine dans 1 cmc. de solution, le changement de potentiel c-à-d. dE est environ de 10 à 12 mv.

D'autre part, la solution d'extrait de 200 rétines par 20 cmc. de solution d'acide biliaire de soude et diluée avec le même volume d'eau salée physiologique ou de liquide de Ringer présente un changement de potentiel atteignant à peu près 50 mv.; on peut en tirer la valeur de dE qui est d'environ 10 mv. Nous en avons déduit que, quand 1 cmc. de solution contient une seule rétine, le potentiel monte d'environ 10 mv. sous l'action de la lumière.

D'après ce résultat, dans le cas où la rétine est soumise à la lumière, son potentiel d'oxydo-réduction est destiné à l'oxydation, tandis que dans le cas où elle demeure à l'obscurité, il est destiné à la réduction; on peut donc dire que l'oxydation se produit dans la rétine sous l'action de la lumière, tandis que la réduction s'y manifeste lorsqu'elle est soumise à l'obscurité.

III. *Diverses influences sur la changement de potentiel qui se produit au moment de l'éclaire.*

A. *Concentration des ions-hydrogène.*

Il est théoriquement facile de comprendre que la concentration des ions-hydrogène a une influence assez importante sur le potentiel d'oxydo-réduction. Il semble que, dans une solution d'extrait à laquelle on ajoute un même volume d'une des solutions tampons ayant différentes concentrations en ions-hydrogène, le changement de potentiel est minimum quand le PH égale 7,7 et la valeur de dE augmente toujours suivant l'élévation ou l'abaissement de la valeur de PH. Dans certains cas d'essais, on note :

PH	4.0	5.0	7.0	7.7	8.0	10.0
dE	12.5	11.3	10.0	7.5	9.3	11.2

En calculant, d'après ces valeurs, le drH c.-à-d. le changement du rH , indice de réduction de Clark représenté par la formule suivante :

$$rH = -\ln p = -\frac{nF}{RT}Eh + nPH$$

on obtient :

$$\begin{aligned}
 drH &= rH^l - rH^\circ = \frac{nF}{RT} Eh^l + nPH - \frac{nF}{RT} Eh^\circ - nPH \\
 &= \frac{nF}{RT} (E^l - E^\circ) \\
 &= \frac{nF}{RT} dE
 \end{aligned}$$

donc

PH	4.0	5.0	7.0	7.7	8.0	1.00
drH	4.9	4.4	3.9	2.9	3.6	4.4

Comme le rH d'un tissu ordinaire est généralement de 17 à 20, le changement atteignant 3 à 5 n'est pas si insignifiant.

En outre, nous avons remarqué dans l'expérience que le potentiel diminue plus tôt lorsque le PH est grand que lorsqu'il est petit, c.-à-d. que, sous l'action répétée de la lumière, le dE diminue plus tôt dans le premier cas que dans le second. Cependant, nous n'affirmons pas qu'il en est toujours ainsi et laissons cela aux recherches postérieures.

B. Influences de certains sels.

1. Le potentiel de la rétine soumise à la lumière ne change presque pas sous l'influence d'une petite quantité de sels de cuivre. Ce phénomène semble contraire au fait que ces sels accélèrent la réduction par la lumière, comme nous l'avons dit plus haut; dans le premier cas ils forment un système chimique de photo-réduction, tandis que dans le cas présent ils restent isolés et ne provoquent jamais l'action réductrice de la lumière. Il va sans dire que le potentiel des sels de cuivre ne subit aucun changement quand ils sont éclairés seuls par la lumière.

2. Par contre, les sels ferriques présentent en eux-mêmes un petit changement de potentiel par la lumière. Or, quand ils sont additionnés à l'extrait de rétine, on voit le potentiel augmenter assez fortement sous l'action de la lumière. Par exemple, le $dE=10$ environ à PH 7.0 devient $dE=13$ environ en augmentant la valeur du PH.

3. Lorsqu'on ajoute à cet extrait une très faible dose de

solution de cyanure de potassium, le potentiel change vite et tombe à peu près au cinquième de la valeur initiale. Il reste longtemps dans cet état et ne change que peu à peu sous l'action répétée de la lumière.

4. Quand on ajoute du toluol, aucun changement de potentiel n'est remarqué tout d'abord, mais une modification assez importante y apparaît en 24 heures: le changement de potentiel dû à la lumière diminue beaucoup et le dE atteint environ 0,3 à 3,0 proportionnellement au temps éclairé et à la quantité de lumière utilisée. Dans ce cas, comme dans celui du cyanure de potassium, on peut provoquer peu à peu et plus lentement encore ce changement de potentiel réduit.

IV. OBSERVATIONS SUR LES RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

De l'expérience précitée nous déduisons ce qui suit:—

Le fait que, dans une solution contenant de la rétine en suspension ou de l'extrait de rétine, le potentiel d'oxydo-réduction augmente sous l'action de la lumière et diminue à nouveau dans l'obscurité nous enseigne que dans la rétine l'oxydation s'effectue en présence de la lumière et la réduction dans l'obscurité.

Ce n'est nullement un fait nouveau que l'oxydation s'accélère dans un corps animal exposé à la lumière. Quinke dit que l'oxydation se manifeste dans le sang soumis à la lumière par réduction de l'hémoglobine qui y est contenue. D'autre part, Hertel a observé aussi que la radiothérapie se base sur l'oxydation accélérée par les rayons. Quant à nous, nous avons pu constater nettement que l'oxydation se produit aussi dans les substances constituant la rétine par le potentiel d'oxydo-réduction de la lumière.

Comme nous venons de le dire, nous avons bien compris que l'oxydation s'effectue dans la rétine exposée à la lumière, mais il est nécessaire avant tout de savoir si c'est une oxydation en sens étroit ou en sens général. Pour cela, on n'a qu'à mesurer la quantité d'oxygène consommée dans la rétine lorsque celle-ci est exposée à la lumière ou abandonnée dans l'obscurité.

Avec la collaboration de Kubowitz, assistant du Professeur

Warburg, Nakashima a examiné, par le manomètre de Warburg, si l'oxygène est consommé de façon différente sous l'action de la lumière ou à l'obscurité; pour réaliser cet essai, ils ont recouru aux rétines mises en suspension dans le liquide de Ringer ou dans le sérum de grenouille. Contrairement à notre pronostic, la consommation de l'oxygène était alors tout à fait identique à la lumière aussi bien qu'à l'obscurité. Cela indique que la consommation de l'oxygène ne subit aucun changement même quand une oxydation se manifeste dans la rétine par l'éclairage. Cependant, comme Rapkine le dit, il y a deux espèces d'oxydation dans l'organisme: 1° Oxydation consommant l'oxygène libéré et 2° Oxydation provenant d'un combiné complexe. Etant donnée l'existence de ces deux sortes d'oxydation et quoiqu'il n'y ait eu aucun changement sur la consommation de l'oxygène par le procédé de Warburg, nous ne prétendrons pas que ce ne fût pas là une oxydation au sens étroit du terme.

Toutefois, comme nous l'avons expliqué plus haut, le principe du potentiel d'oxydo-réduction n'est point basé sur l'oxydo-réduction au sens étroit mais sur l'oxydo-réduction au sens large c.-à-d. sur la libération et l'adjonction des électrons. L'oxydo-réduction constatée dans la rétine est originairement mesurée par le potentiel d'oxydo-réduction, par conséquent pour se rendre compte de ces deux phénomènes à la fois, il sera plus aisé de penser à l'oxydation au sens large c.-à-d. à la libération des électrons d'une substance contenue dans la rétine au moment de l'éclairement.

Cependant, étant donné que les électrons se libèrent dans la rétine sous l'influence de la lumière, il ne faudrait pas considérer ce phénomène comme une simple oxydation au sens général. On connaît bien sous le nom de phénomène photo-électrique ce phénomène où les électrons sont libérés par les rayons. Dans ces conditions, on peut croire que le phénomène photoélectrique se produit dans la rétine.

Il est très intéressant de savoir quelle est la substance de la rétine qui y participe.

Qu'est-ce qui est contenu dans une solution d'extrait de rétine sans parler de la rétine elle-même? Comme nous l'avons décrit

ailleurs, cette solution contient des sels inorganiques, quelques composés protéiques, beaucoup de lipoïdes et une très petite quantité de fer (0,003 mg./cmc. environ quand elle contient une seule rétine).

Le cyanure de potassium influant généralement sur les métaux lourds constitue des sels doubles et empêche leur action catalytique. Le fer et le cuivre présentent une réaction du bleu de phénol indien (dite: réaction des oxydases). D'autre part, des sels de cuivre ajoutés font disparaître le changement de potentiel en question, tandis que des sels ferriques semblent l'accentuer.

Considérant que le changement du potentiel est réduit au cinquième par addition du cyanure de potassium et qu'il est augmenté plus ou moins par addition des sels ferriques, on peut supposer que ces derniers jouent dans ce changement un rôle important.

Enfin, des faits que le changement du potentiel diminue beaucoup par l'action prolongée du toluol, qu'il ne disparaît pas complètement sous l'action du cyanure de potassium et que ce dernier contient une grande quantité de lipoïdes, on peut déduire que les lipoïdes y jouent aussi un grand rôle.

En résumé, le fer et les lipoïdes jouent un rôle important dans l'oxydation au sens général (ou dans le phénomène photo-électrique) qui se manifeste dans la rétine exposée à la lumière.

V. NOS RÉSULTATS ET LA THÉORIE DE SCHANZ SUR LA VISION.

Il y a quelques années, Schanz a publié une théorie intéressante de la vision en rapport avec le phénomène photoélectrique. D'après lui, l'épithélium pigmentaire de la rétine absorbe des rayons et provoque un phénomène photoélectrique libérant les électrons; ceux-ci sont perçus par la rétine, se transforment en courant électrique ou en énergie physiologique et arrivent enfin au centre cérébral.

Cependant étant donnés nos résultats, il n'est pas nécessaire de prétendre avec Schanze que cette action existe surtout dans l'épithélium pigmentaire et il suffit de penser que le même phénomène se manifeste dans certaines substances de la rétine elles-mêmes

telles que les cellules visuelles et que la vision se produit suivant le processus observé par lui. N'ayant pas observé par le même procédé le changement de potentiel que donnait l'épithélium pigmentaire, nous ne pouvons confirmer le dit préjugé.

Les défauts constatés jusqu'à présent quant à la théorie de Schanz sont basés sur les faits que l'albinos a une vision normale et que le courant électrique agit même lorsqu'on emploie la rétine seule, etc. Or, ces faits sont aisément expliqués par ce phénomène photoélectrique qui se manifeste dans les substances de la rétine. D'autre part, le fait que la rétine décollée diminue la vision, d'où émane la thérie de Schanz, peut se traduire facilement par l'état métabolique de la rétine, qu'il s'agisse d'un animal à sang chaud (comme le corps humain), ou qu'elle soit portée à une haute température.

On arrive évidemment ainsi à la théorie de la vision par électrons, décrite par Schanz, sans avoir recours à l'épithélium pigmentaire. Nous trouvons cet argument très intéressant mais nous voulons en laisser la confirmation à une étude postérieure.

VI. POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION ET POURPRE RÉTINIEN.

Au cours de l'expérience, le pourpre visuel se décolore presque complètement par la première exposition à la lumière. Or, le changement de potentiel se manifeste indépendamment de la présence ou de l'absence du pourpre rétinien. Ce changement était parfois plus intense en son absence qu'en sa présence. Quoi qu'il en soit, nous ne pouvons affirmer ici dans quelle limite le changement de potentiel a des rapports avec la vision, mais il est certain qu'il est presque complètement indépendant du pourpre visuel.

Dans cette expérience nous n'avons pas eu l'occasion de recourir à une lumière faible, mais sous une lumière relativement forte, le pourpre rétinien semblait ne pas jouer un grand rôle.

VII. TABLEAUX EXPÉRIMENTAUX.

Enfin, nous énumérons ci-joint les tableaux qui ont servi à nos études expérimentales.

TABLEAUX EXPÉRIMENTAUX.

1. Solution de rétines en suspension.

$c_0 = 15$ rétines dans 5 cmc. de NaCl-solution.

$t = 2.0^\circ\text{C}$,

PH = 6.0

t_0	+0.0344	23	+0.0660	46	+0.0409
1	+0.0344	24	+0.0661	47	+0.0409
2	+0.0326	25	+0.0663	48	+0.0407
3	+0.0320	26	+0.0666	49	+0.0403
4	+0.0322	27	+0.0660	50	+0.0408
5	+0.0323	28	+0.0659	51	+0.0402
6	+0.0323	29	+0.0660	52	+0.0402
7	+0.0323	30	+0.0664	Eclaircement	
8	+0.0323	31	+0.0664	52 ₃₀	+0.0560
9	+0.0314	32	+0.0665	53	+0.0589
10	+0.0312	33	+0.0666	53 ₃₀	+0.0688
11	+0.0306	34	+0.0665	54	+0.0644
12	+0.0306	35	+0.0665	54 ₃₀	+0.0652
13	+0.0306	36	+0.0655	55	+0.0660
14	+0.0306	37	+0.0665	55 ₃₀	+0.0675
Eclaircement		Obscurité		56	+0.0682
15	+0.0413	38	+0.0545	57	+0.0685
16	+0.0590	39	+0.0505	58	+0.0681
17	+0.0635	40	+0.0471	59	+0.0681
18	+0.0644	41	+0.0453	60	+0.0682
19	+0.0655	42	+0.0447	61	+0.0684
20	+0.0662	43	+0.0434	62	+0.0684
21	+0.0665	44	+0.0425		
22	+0.0663	45	+0.0410		

2. Suspension de rétine.

$c_0 = 15$ rétines dans 5 cmc. de solution de Ringer.

$t = 20^\circ\text{C}$,

PH = 7.4

t_0	-0.0320	Eclaircement		20	-0.0203
2	-0.0335	11 ₃₀	-0.0332	Obscurité	
3	-0.0337	12	-0.0275	20 ₃₀	-0.0266
4	-0.0340	12 ₃₀	-0.0252	21	-0.0295
5	-0.0345	13	-0.0235	22	-0.0297
6	-0.0348	14	-0.0220	23	-0.0324
7	-0.0350	15	-0.0214	24	-0.0343
8	-0.0353	16	-0.0212	25	-0.0354
9	-0.0356	17	-0.0208	26	-0.0369
10	-0.0358	18	-0.0205	27	-0.0374
11	-0.0361	19	-0.0205	28	-0.0377

29	—0.0380	42	—0.0278		Obscurité
30	—0.0383	41	—0.0251	54	₈₀ —0.0149
31	—0.0385	43	—0.0310	55	—0.0206
32	—0.0387	44	—0.0322	55	₈₀ —0.0237
	Eclairement	45	—0.0328	56	—0.0259
32	₈₀ —0.0270	46	—0.0328	57	—0.0294
33	—0.0165		Eclairement	58	—0.0305
33	₈₀ —0.0126	46	₈₀ —0.0236	59	—0.0322
34	—0.0097	47	—0.0190	60	—0.0337
35	—0.0085	47	₈₀ —0.0122	61	—0.0344
36	—0.0076	48	—0.0096	62	—0.0351
37	—0.0065	49	—0.0065	63	—0.0359
38	—0.0065	50	—0.0058	64	—0.0363
39	—0.0065	51	—0.0046	65	—0.0365
	Obscurité	52	—0.0046	66	—0.0367
39	₈₀ —0.0143	53	—0.0046	67	—0.0370
40	—0.0210	54	—0.0046		

3. Extrait de rétine.

 $c_0 = 200$ rétines dans 20 cme. de Na. cholol. solution. $c = 2.5$ cme. d'extrait + 2.5 cme. de NaCl-solution. $t = 20^\circ\text{C}$

t_0	0.1698	22	0.1124	43	0.1092
1	0.1702	23	0.1119	45	0.1098
2	0.1702	24	0.1121	46	0.1087
3	0.1703	25	0.1116	47	0.1088
4	0.1703	25	₈₀ 0.1111	48	0.1086
5	0.1711	26	0.1105	49	0.1087
6	0.1697	27	0.1108	50	0.1083
6	₈₀ 0.7693	28	0.1110	51	0.1082
7	0.1700	29	0.1114		Obscurité
8	0.1709	30	0.1110	52	0.1418
9	0.1717	31	0.1093	53	0.1540
10	0.1725	31	₈₀ 0.1094	54	0.1609
11	0.1729	32	0.1094	55	0.1602
12	0.1729	33	0.1085	56	0.1594
13	0.1729	34	0.1085	57	0.1613
	Eclairement	35	0.1090	58	0.1624
14	₈₀ 0.1501	36	0.1090	59	0.1642
15	₈₀ 0.1306	37	0.1078	60	0.1648
17	0.1212	38	0.1080	61	0.1648
18	0.1158	39	0.1083	62	0.1653
19	0.1148	40	0.1081	63	0.1650
20	0.1144	41	0.1073	64	0.1649
21	0.1138	42	0.1068		

4. Extrait de rétine.

 $c_0 = 200$ rélines dans 20 cme. de Na. cholal. solution.

 $c = 3$ cme. d'extrait + 3 cme. de solution de NaCl.

 $t = 20^\circ \text{C}$

t_0	-0.1257	32	-0.0918	60	-0.1146
1	-0.1246	32	₃₀ -0.0967	61	-0.1152
2	-0.1238	33	-0.1054	62	-0.1148
3	-0.1233	34	-0.1097	Eclairement	
4	-0.1229	35	-0.1154	62	-0.0765
5	-0.1221	36	-0.1159	62	₃₀ -0.0741
6	-0.1215	37	-0.1165	63	-0.0721
7	-0.1209	38	-0.1172	64	-0.0686
8	-0.1209	39	-0.1173	65	-0.0670
9	-0.1207	40	-0.1176	66	-0.0668
10	-0.1204	41	-0.1179	67	-0.0662
11	-0.1204	42	-0.1188	Obscurité	
12	-0.1203	43	-0.1189	68	-0.0813
13	-0.1204	44	-0.1190	69	-0.0921
Eclairement		45	-0.1192	70	-0.1038
14	-0.0733	46	-0.1192	71	-0.1102
15	-0.0749	47	-0.1192	72	-0.1106
16	-0.0768	Eclairement		73	-0.1109
17	-0.0738	48	-0.0701	74	-0.1117
18	-0.0727	48	₃₀ -0.0702	Eclairement	
19	-0.0724	49	-0.0701	74	₃₀ -0.1003
20	-0.0728	50	-0.0682	75	-0.0863
21	-0.0721	51	-0.0665	76	-0.0865
22	-0.0714	52	-0.0655	77	-0.0863
23	-0.0708	53	-0.0659	78	-0.0862
24	-0.0704	Obscurité		79	-0.0861
25	-0.0701	54	-0.0853	Obscurité	
26	-0.0695	54	₃₀ -0.0997	79	₃₀ -0.0960
27	-0.0694	55	-0.1134	80	-0.1027
28	-0.0694	55	₃₀ -0.1131	81	-0.1050
29	-0.0693	56	-0.1130	82	-0.1080
30	-0.0693	57	-0.1133	83	-0.1095
Obscurité		58	-0.1140	84	-0.1112
31	-0.0818	59	-0.1152	85	-0.1117

5. Extrait de rétine.

 $c_0 = 160$ rélines dans 30 cme. de Na. cholal. solution.

 $\text{PH} = 7.7$

t_0	-0.1103	2	-0.1084	4	-0.1081
1	-0.1085	3	-0.1081	5	-0.1081

6	-0.1081	24	-0.1000	43	-0.0865
7	-0.1081	25	-0.1032	44	-0.0863
8	-0.1081	26	-0.1048	45	-0.0863
9	-0.1081	27	-0.1058	Obscurité	
10	-0.1081	28	-0.1079	46	-0.0902
11	-0.1081	29	-0.1086	47	-0.0924
12	-0.1081	30	-0.1088	48	-0.0950
13	-0.1081	31	-0.1088	49	-0.0975
14	-0.1081	32	-0.1087	50	-0.0989
15	-0.1081	33	-0.1087	51	-0.1000
Eclairément		Eclairément		52	-0.1034
16	-0.0888	34	-0.0957	53	-0.1049
17	-0.0890	35	-0.0926	54	-0.1051
18	-0.0896	36	-0.0900	55	-0.1065
19	-0.0896	37	-0.0888	56	-0.1075
20	-0.0892	38	-0.0883	57	-0.1086
21	-0.0890	39	-0.0874	58	-0.1086
22	-0.0890	40	-0.0873	59	-0.1087
Obscurité		41	-0.0866	60	-0.1086
23	-0.1003	42	-0.0866		

6. Extrait de rétine.

 $c_0 = 160$ rétines dans 30 emc. de Na. cholal. solution.

PH = 4.0

t_0	+0.0069	19	+0.0393	38	+0.0061
1	+0.0069	20	+0.0394	39	+0.0060
2	+0.0055	21	+0.0394	Eclairément	
3	+0.0058	22	+0.0394	40	+0.0363
4	+0.0058	Obscurité		41	+0.0417
5	+0.0058	23	+0.0219	42	+0.0433
6	+0.0058	24	+0.0180	43	+0.0452
7	+0.0059	25	+0.0147	44	+0.0463
8	+0.0059	26	+0.0138	45	+0.0475
9	+0.0058	27	+0.0121	46	+0.0481
10	+0.0059	28	+0.0108	47	+0.0489
11	+0.0058	29	+0.0103	48	+0.0492
12	+0.0058	30	+0.0092	49	+0.0495
13	+0.0058	31	+0.0089	50	+0.0497
Eclairément		32	+0.0086	51	+0.0497
14	+0.0345	33	+0.0083	Obscurité	
15	+0.0393	34	+0.0077	52	+0.0305
16	+0.0394	35	+0.0073	53	+0.0252
17	+0.0383	36	+0.0071	54	+0.0222
18	+0.0837	37	+0.0065	55	+0.0197

56	+0.0187	61	+0.0145	65	+0.0495
57	+0.0174	62	+0.0144	66	+0.0519
58	+0.0154	Eclairement		67	+0.0519
59	+0.0148	63	+0.0471	68	+0.0520
60	+0.0146	64	+0.0480		

7. Extrait de rétine.

 $c_0=90$ rélines dans 18 cmc. de Na. cholal. solution.

PH = 5,0

t_0	-0.1439	23	-0.1344	48	-0.1311
1	-0.1437	24	-0.1349	49	-0.1315
2	-0.1435	25	-0.1355	50	-0.1315
3	-0.1432	26	-0.1353	51	-0.1315
4	-0.1430	27	-0.1353	Eclairement	
5	-0.1425	28	-0.1349	52	-0.1194
6	-0.1422	29	-0.1349	53	-0.1130
7	-0.1420	Eclairement		54	-0.1125
8	-0.1420	30	-0.1148	55	
9	-0.1420	31	-0.1121	56	-0.1102
10	-0.1420	32	-0.1112	57	-0.1106
Eclairement		32	-0.1112	58	-0.1110
10	-0.1273	34	-0.1106	59	-0.1111
11	-0.1244	35	-0.1106	60	-0.1121
11	-0.1171	36	-0.1088	61	-0.1121
12	-0.1133	37	-0.1077	62	-0.1121
13	-0.1148	38	-0.1077	63	-0.1121
14	-0.1189	39	-0.1077	Obscurité	
15	-0.1198	Obscurité		64	-0.1237
16	-0.1198	40	-0.1278	65	-0.1259
17	-0.1190	41	-0.1295	66	-0.1309
18	-0.1186	42	-0.1295	67	-0.1310
19	-0.1178	43	-0.1306	68	-0.1310
Obscurité		44	-0.1306	69	-0.1305
20	-0.1339	45	-0.1307	70	-0.1305
21	-0.1344	46	-0.1307		
22	-0.1344	47	-0.1307		

8. Extrait de rétine.

 $c_0=90$ rélines dans 18 cmc. de Na. cholal. solution.

PH = 8,0

t_0	-0.2165	4	-0.2152	8	-0.2145
1	-0.2164	5	-0.2149	9	-0.2145
2	-0.2160	6	-0.2148	10	-0.2145
3	-0.3156	7	-0.2147	11	-0.2145

12	-0.2145	37	-0.2235	62	-0.2291
	Eclairement	38	-0.2230	63	-0.2291
13	-0.1771	39	-0.2226	64	-0.2288
14	-0.1791	40	-0.2226	66	-0.2294
15	-0.1797	41	-0.2226	68	-0.2304
16	-0.1815	42	-0.2232		Eclairement
17	-0.1831	43	-0.2239	70	-0.2159
18	-0.1862	44	-0.2249	71	-0.2151
19	-0.1865	45	-0.2260	72	-0.2151
20	-0.1874		Eclairement	73	-0.2151
21	-0.1874	46	-0.2089	74	-0.2154
22	-0.1876	47	-0.2078	75	-0.2154
23	-0.1880	48	-0.2069	76	-0.2168
24	-0.1888	49	-0.2065	77	-0.2167
25	-0.1899	50	-0.2065	78	-0.2168
26	-0.1907	51	-0.2073	79	-0.2168
27	-0.1913	52	-0.2073	80	-0.2168
28	-0.1918	53	-0.2075		Obscurité
19	-0.1923	54	-0.2077	81	-0.2363
30	-0.1932	55	-0.2080	82	-0.2364
31	-0.1936	56	-0.2082	83	-0.2363
32	-0.1946	57	-0.2082	84	-0.2363
33	-0.1956	58	-0.2085	85	-0.2366
	Obscurite		Obscurité	86	-0.2370
34	-0.2204	59	-0.2272	87	-0.2370
35	-0.2221	60	-0.2288	88	-0.2370
36	-0.2235	61	-0.2288		

9. Extrait de rétine.

$c_0 = 160$ rélines dans 30 cme. de Na. cholal. solution.

PH = 10.0

t_0	-0.1152	12	-0.1020	24	-0.1105
1	-0.1155	13	-0.1000	25	-0.1112
2	-0.1157	14	-0.0875	26	-0.1112
3	-0.1157	15	-0.0882	27	-0.1103
4	-0.1157	16	-0.0887	28	-0.1102
5	-0.1157	17	-0.0876	29	-0.1102
6	-0.1157	18	-0.0870	30	-0.1102
7	-0.1157	19	-0.0859	31	-0.1102
8	-0.1157	20	-0.0859		Eclairement
9	-0.1157	21	-0.0859	32	-0.0901
10	-0.1157		Obscurité	33	-0.0867
	Eclairement	22	-0.1029	34	-0.0855
11	-0.1060	23	-0.1105	35	-0.0837

36	-0.0833	52	-0.0992	65	-0.0867
37	-0.0825	53	-0.0995	Obscurité	
38	-0.0815	54	-0.0998	66	-0.0949
42	-0.0813	55	-0.1000	67	-0.0955
43	-0.0815	56	-0.1000	68	-0.0961
44	-0.0815	57	-0.1000	69	-0.0966
45	-0.0815	Eclairement		70	-0.0979
Obscurité		58	-0.0941	71	-0.1000
46	-0.0944	59	-0.0912	72	-0.0998
47	-0.0972	60	-0.0898	73	-0.1002
48	-0.0979	61	-0.0890	74	-0.1000
49	-0.0983	62	-0.0872	75	-0.1000
50	-0.0986	63	-0.0868		
51	-0.0990	64	-0.0868		

10. Extrait de rétine.

100 rétines dans 20 cmc. de Na. cholal. solution.

PH = 7.4

t_0	-0.1045	27	-0.0837	3	+0.0760
1	-0.1051	28	-0.0832	4	+0.0757
2	-0.1054	29	-0.0829	5	+0.0755
3	-0.1056	30	-0.0819	Eclairement	
4	-0.1057	31	-0.0819	6	+0.0740
5	-0.1061	32	-0.0826	7	+0.0738
6	-0.1061	33	-0.0824	8	+0.0734
7	-0.1062	34	-0.0828	9	+0.0728
8	-0.1062	35	-0.0828	10	+0.0728
9	-0.1061	35	-0.0828	11	+0.0722
10	-0.1062	Obscurité		12	+0.0721
Eclairement		36	-0.0975	13	+0.0719
10 ₃₀	-0.0919	37	-0.0910	14	+0.0711
16	-0.0842	38	-0.1022	15	+0.7711
17	-0.0850	39	-0.1024	16	+0.0708
18	-0.0850	40	-0.1026	17	+0.0703
19	-0.0851	41	-0.1027	18	+0.0702
20	-0.0850	42	-0.1029	19	+0.0695
Obscurité		43	-0.1035	20	+0.0678
20 ₃₀	-0.1002	44	-0.1041	21	+0.0677
21	-0.1037	45	-0.1041	Obscurité	
22	-0.1048	Ajoutée de CuCl ₂		22	+0.0680
23	-0.1051	(Concentration finale:		23	+0.0675
24	-0.1051	1/1000 N)		24	+0.0669
25	-0.1052	t_0'	+0.0768	25	+0.0669
Eclairement		1	+0.0765	26	+0.0668
26	-0.0850	2	+0.0763	27	+0.0667

Eclairement	34	+0.0655	40	+0.0643
28 +0.0662	Obscurité		41	+0.0637
29	35	+0.0647	42	+0.0632
30 +0.0662	36	+0.0647	43	+0.0632
31 +0.0662	37	+0.0647	44	+0.0632
32 +0.0662	38	+0.0643		
33 +0.0659	39	+0.0643		

11. Extrait de rétine.

100 rétines dans 20 cme. de Na. cholal. solution.

PH = 7.0, $t = 20^{\circ}\text{C}$

t_0	-0.1204	27	-0.0874	10	-0.1023
1	-0.1200	28	-0.0866	11	-0.1018
2	-0.1202	29	-0.0866	12	-0.1017
3	-0.1200	Obscurité		14	-0.1015
4	-0.1200	30	-0.1094	Obscurité	
5	-0.1292	31	-0.1099	15	-0.1297
6	-0.1199	32	-0.1102	16	-0.1306
7	-0.1200	33	-0.1103	17	-0.1310
8	-0.1197	34	-0.1092	18	-0.1315
9	-0.1200	35	-0.1092	19	-0.1322
Eclairement		Eclairement		20	-0.1325
10	-0.0971	40	-0.0857	21	-0.1325
11	-0.0945	41	-0.0855	Eclairement	
12	-0.0935	42	-0.0839	22	-0.1028
13	-0.0925	43	-0.0840	23	-0.1018
14	-0.0926	44	-0.0838	24	-0.0992
15	-0.0925	Addition de FeSO_4		25	-0.0984
Obscurité		(Concentration finale:		26	-0.0978
16	-0.1141	1/500 N)		27	-0.0978
17	-0.1151	t_0'	-0.1373	28	-0.0974
18	-0.1152	1	-0.1369	29	-0.0970
19	-0.1144	2	-0.1365	Obscurité	
20	-0.1138	3	-0.1361	30	-0.1250
21	-0.1136	4	-0.1358	31	-0.1266
22	-0.1136	5	-0.1355	32	-0.1271
23	-0.1137	6	-0.1350	33	-0.1262
Eclairement		7	-0.1345	34	-0.1261
24	-0.0904	Eclairement		35	-0.1263
25	-0.0893	8	-0.1071	36	-0.1263
26	-0.0884	9	-0.1049		

12. Extrait de rétine.

200 rétines dans 20 emc. de Na. cholal. solution.

 $t = 20^{\circ}\text{C}$

t_0	-0.1721	32	-0.1590	25	-0.2824
1	-0.1727	33	-0.1596	26	-0.2829
2	-0.1727	34	-0.1600	27	-0.2830
3	-0.1735	35	-0.1600	28	-0.2829
4	-0.1739	36	-0.1600	29	-0.2827
5	-0.1743	Addition de KCN (Concentration finale: 1/500 N)		Eclairement	
6	-0.1746			29	₃₀ -0.2745
7	-0.1743			30	-0.2743
8	-0.1743	t_0'	-0.2876	31	-0.2742
9	-0.1740	1	-0.2872	32	-0.2741
10	-0.1739	2	-0.2868	33	-0.2741
Eclairement		3	-0.2865	Obscurité	
		4	-0.2863		
10	₃₀ -0.1508	5	-0.2861	33	₃₀ -0.2806
11	-0.1409	6	-0.2859	34	-0.2811
11	₃₀ -0.1371	7	-0.2855	35	-0.2818
12	-0.1350	8	-0.2852	36	-0.2817
12	₃₀ -0.1345	9	-0.2851	37	-0.2816
13	-0.1344	10	-0.2850	38	-0.2814
14	-0.1322	Eclairement		Eclairement	
15	-0.1301				
16	-0.1294	10	₃₀ -0.2702	38	₃₀ -0.2733
17	-0.1290	11	-0.2701	39	-0.2719
18	-0.1287	12	-0.2701	40	-0.2721
19	-0.1275	13	-0.2696	41	-0.2720
20	-0.1264	14	-0.2696	42	-0.2718
21	-0.1249	15	-0.2695	43	-0.2719
22	-0.1235	Obscurité		Obscurité	
23	-0.1226				
24	-0.1221	15	₃₀ -0.2817	43	₃₀ -0.2803
25	-0.1221	16	-0.2837	44	-0.2809
26	-0.1221	17	-0.2844	45	-0.2809
Obscurité		18	-0.2844	46	-0.2809
		19	-0.2840		
26	₃₀ -0.1369	20	-0.2842	Eclairement	
27	-0.1454				
27	₃₀ -0.1487	Eclairement		47	-0.2740
28	-0.1454			21	-0.2740
28	₃₀ -0.1538	22	-0.2733	49	-0.2725
29	-0.1560	23	-0.2733	50	-0.2726
30	-0.1572	24	-0.2733	51	-0.2730
31	-0.1585	Obscurité		Obscurité	
		24	₃₀ -0.2815	51	₃₀ -0.2810
				52	-0.2813
				53	-0.2813

54	-0.2812	64	-0.2731	75	-0.2804
55	-0.2810	65	-0.2732	76	-0.2802
Eclairement		66	-0.2733	77	-0.2800
55 ₃₀	-0.2738	67	-0.2734	Eclairement	
56	-0.2736	Obscurité		77 ₃₀	-0.2739
57	-0.2736	67 ₃₀	-0.2795	78	-0.2734
58	-0.2736	68	-0.2802	79	-0.2735
Obscurité		69	-0.2802	80	-0.2737
58 ₃₀	-0.2805	70	-0.2800	81	-0.2738
59	-0.2803	71	-0.2799	82	-0.2739
60	-0.2802	72	-0.2798	Obscurité	
61	-0.2801	Eclairement		82 ₃₀	-0.2790
62	-0.2800	72 ₃₀	-0.2719	83	-0.2791
Eclairement		Obscurité		84	-0.2791
62 ₃₀	-0.2728	73	-0.2785		
63	-0.2730	74	-0.2809		

13. Extrait de rétine.

80 rélines dans 16 cmc. de Nachol. solution.

Ajoutée de Toluol.

I		13	-0.0279	6	-0.0469
t_0	-0.0387	16	-0.0279	Eclairement	
1	-0.0381	17	-0.0273	7	-0.0463
2	-0.0375	18	-0.0275	8	-0.0462
3	-0.0370	Obscurité		9	-0.0460
4	-0.0252	19	-0.0274	10	-0.0467
5	-0.0360	20	-0.0275	11	-0.0467
6	-0.0344	21	-0.0275	Obscurité	
7	-0.0334	II		12	-0.0459
8	-0.0330	t_0	-0.0482	13	-0.0459
9	-0.0322	1	-0.0477	14	-0.0459
10	-0.0314	2	-0.0475	15	-0.0458
11	-0.0314	3	-0.0474	16	-0.0457
Eclairement		4	-0.0474		
12	-0.0295	5	-0.0474		

14. Extrait de rétine.

Ajoutée de Toluol.

t_0	-0.1141	6	-0.1137	11	-0.1058
1	-0.1151	7	-0.1136	12	-0.1066
2	-0.1152	Eclairement		13	-0.1066
3	-0.1143	8	-0.1074	Obscurité	
4	-0.1138	9	-0.1073	14	-0.1094
5	-0.1137	10	-0.1064	15	-0.1099

16	-0.1102	Eclairement		23	-0.1040
17	-0.1103	20	-0.1057	24	-0.1038
18	-0.1097	21	-0.1055		
19	-0.1096	22	-0.1039		

15. NaCl-solution.

t_0	+0.1287	9	+0.1255	Obscurité	
1	+0.1274	10	+0.1254	19	+0.1247
2	+0.1275	11	+0.1254	20	+0.1260
3	+0.1274	12	+0.1254	21	+0.1270
4	+0.1273	13	+0.1256	22	+0.1265
5	+0.1274	14	+0.1255	23	+0.1265
6	+0.1274	15	+0.1260	24	+0.1255
7	+0.1273	16	+0.1258	25	+0.1255
Eclairement		17	+0.1255	26	+0.1254
8	+0.1264	18	+0.1255	27	+0.1255

16. Solution de Ringer.

t_0	+0.0525	12	+0.0500	24	+0.0484
1	+0.0539	15	+0.0492	Obscurité	
2	+0.0536	Eclairement		25	+0.0477
3	+0.0532	16	+0.0490	26	+0.0476
4	+0.0532	17	+0.0489	27	+0.0476
5	+0.0522	18	+0.0487	28	+0.0475
6	+0.0514	19	+0.0486	31	+0.0477
7	+0.0509	20	+0.0485	32	+0.0484
8	+0.0504	21	+0.0485	33	+0.0484
9	+0.0503	22	+0.0484	35	+0.0482
10	+0.0502	23	+0.0483		

17. Solution de Na. cholal.

t_0	-0.0246	14	-0.0304	26	-0.0379
1	-0.0259	15	-0.0309	27	-0.0391
2	-0.0261	16	-0.0313	28	-0.0404
3	-0.0265	17	-0.0325	29	-0.0407
4	-0.0268	18	-0.0351	30	-0.0413
5	-0.0273	19	-0.0353	31	-0.0416
6	-0.0276	Eclairement		32	-0.0424
7	-0.0279	20	-0.0355	33	-0.0430
8	-0.0285	21	-0.0353	34	-0.0433
9	-0.0291	22	-0.0353	Eclairement	
10	-0.0299	23	-0.0356	36	-0.0433
11	-0.0300	24	-0.0356	37	-0.0433
12	-0.0301	Obscurité		38	-0.0434
13	-0.0301	25	-0.0365	39	-0.0435

40	-0.0437		Obscurité		Eclairement
41	-0.0444	52	-0.0526	62	-0.0583
42	-0.0456	53	-0.0532	63	-0.0574
43	-0.0466	54	-0.0545	64	-0.0570
44	-0.0474	55	-0.0554	65	-0.0570
45	-0.0485	56	-0.0564	66	-0.0572
46	-0.0490	57	-0.0570	67	-0.0577
47	-0.0491	58	-0.0578	68	-0.0585
48	-0.0493	59	-0.0582	69	-0.0585
49	-0.0499	60	-0.0583	70	-0.0592
50	-0.0507	61	-0.0587	71	-0.0597
51	-0.0517				

Avant de terminer, nous exprimons nos sincères remerciements à Monsieur Ch. Oguchi, Professeur à la Faculté de médecine de Nagoya et à Monsieur K. Kodama, Professeur à l'Université Imperiale de Fukuoka, pour tous les précieux conseils qu'ils nous ont donnés et les corrections dont ils ont bien voulu se charger.

Fig. 1.

Suspension de rétine.

 $c_0 = 15$ rétines dans 5 cmc. de NaCl-solution. $t = 20^\circ \text{C}$

PH = 6.0

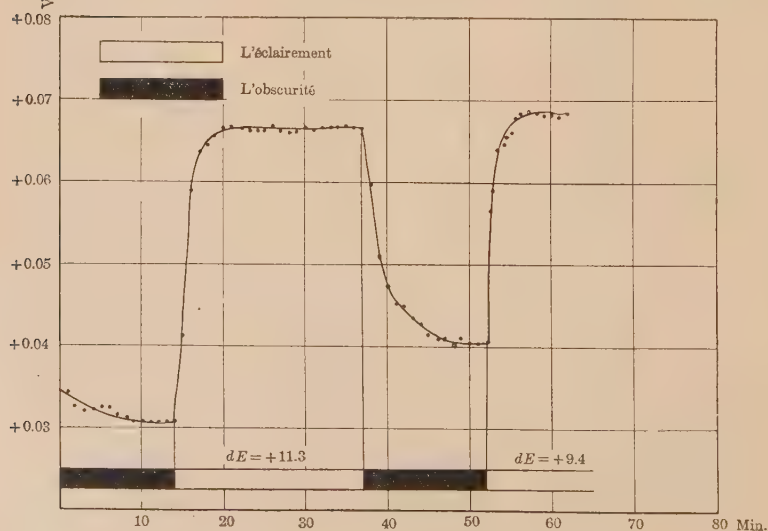


Fig. 2.

Suspension de rétine. $c_0 = 15$ rélines dans 5 cmc. de Ringer-solution.
 $t = 20^\circ \text{C}$ PH = 7.4

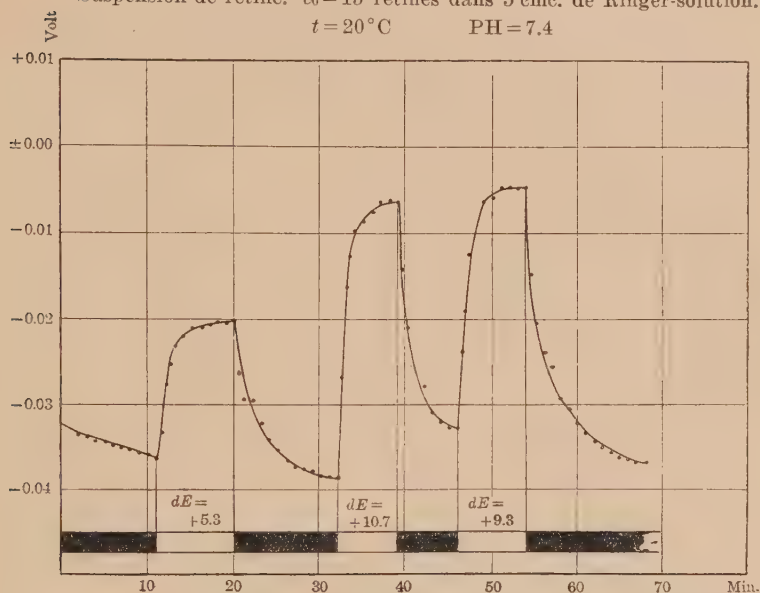


Fig. 3.

Extrait de rétine.

$c_0 = 200$ rélines dans 20 cmc. de Na, cholal.
 $e = 2.5$ cmc. d'extrait + 2.5 cmc. de NaCl-solution.
 $t = 20^\circ \text{C}$

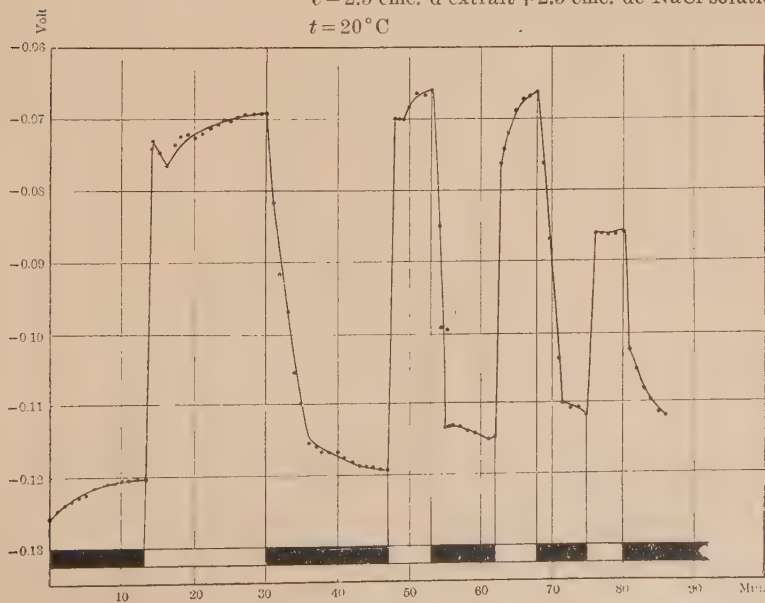


Fig. 4.

Extrait de rétine.
Influence du PH

$c_0 = 160$ rélines dans 30 cme. de Na, cholal.
 $c = 3$ cme d'extrait + 3 cme. de solution tampon.
 $t = 25^\circ \text{C}$ PH = 4.0

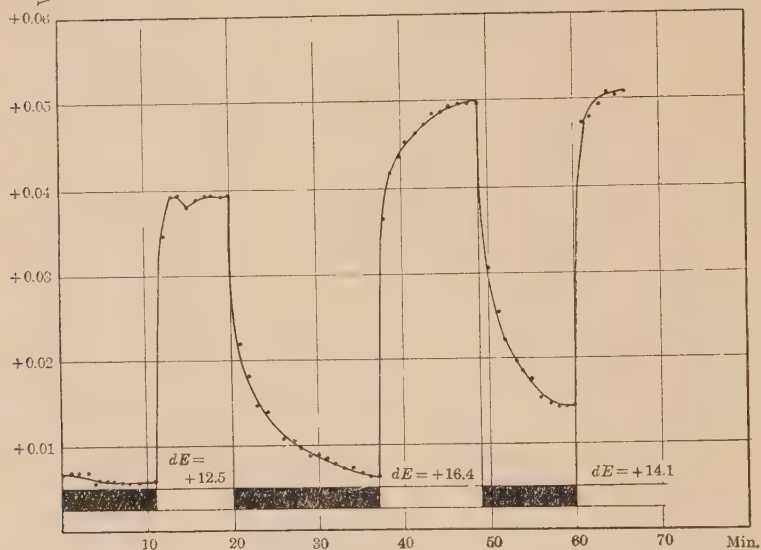


Fig. 5.

Extrait de rétine.
Influence d. PH

$c_0 = 160$ rélines dans 30 cme. de Na, Cholal.
 $c = 3$ cme. d'extrait + 3 cme. de solution tampon.
 $t = 25^\circ \text{C}$ PH = 7.7

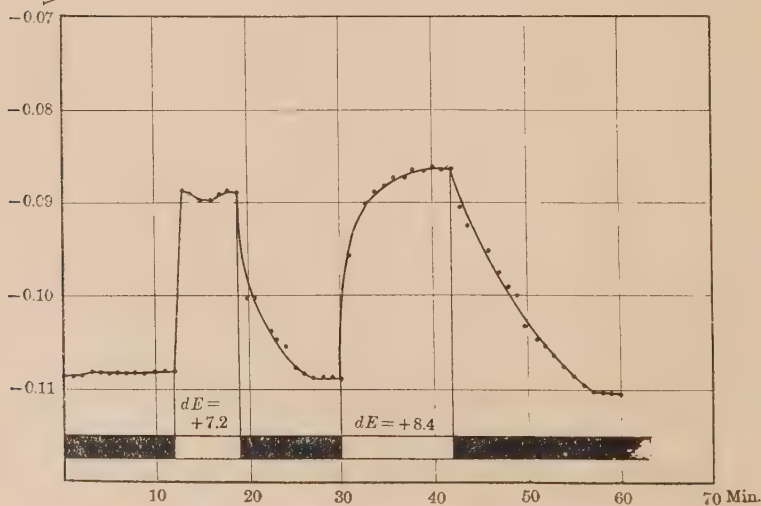


Fig. 6.

Extrait de rétine
Influence du PH

$c_0 = 160$ rétines dans 30 cme. de Na. cholal.
 $c = 3$ cme. d'extrait + 3 cme. de solution tampon.
 $t = 25^\circ\text{C}$ PH = 10.0

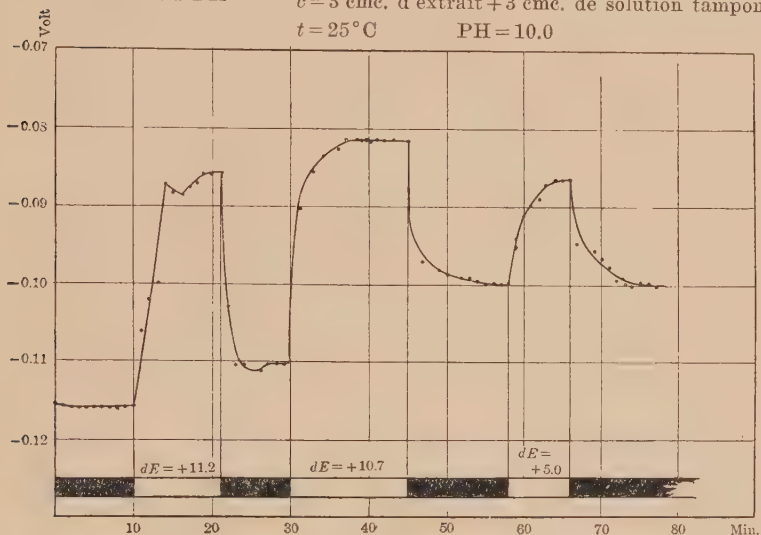


Fig. 7.

Extrait de rétine.
Influence du CuCl_2

$c_0 = 100$ rétines dans 20 cme. de Na. cholal.
 $c = 3$ cme. d'extrait + 3 cme. de Solution tampon.
 $t = 20^\circ\text{C}$ PH = 7.4

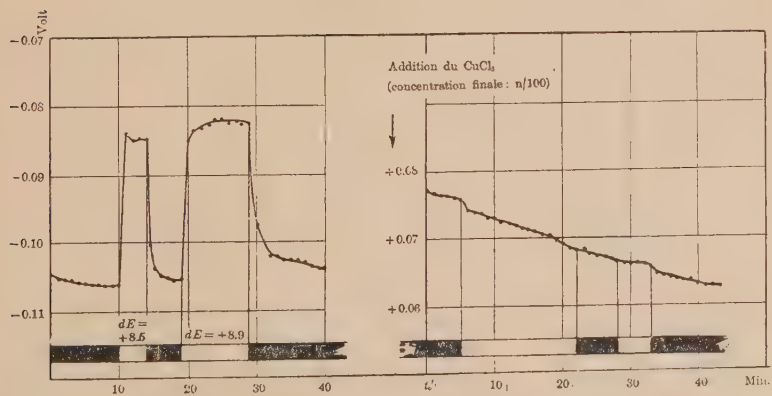


Fig. 8.

 $c_0 = 100$ rélines dans 20 cme. de Na. cholal. $c = 3$ cme. d'extrait + 3 cme. de Solution tampon. $t = 20^\circ \text{C}$

PH = 7.0

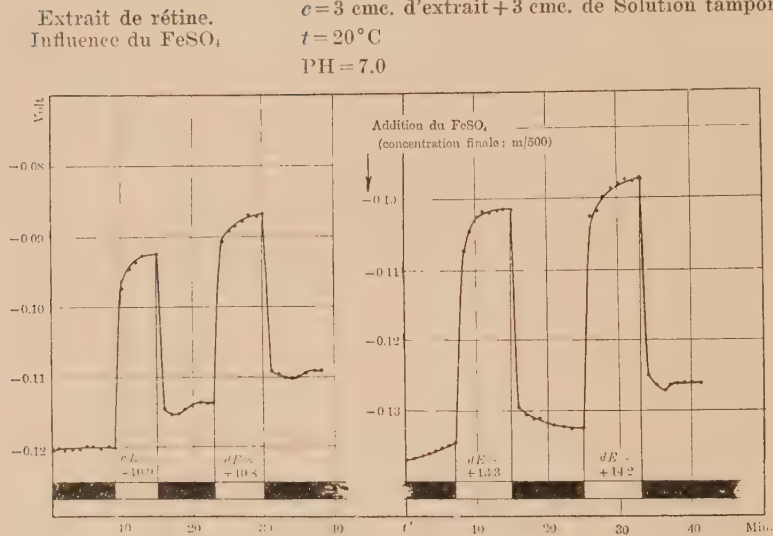
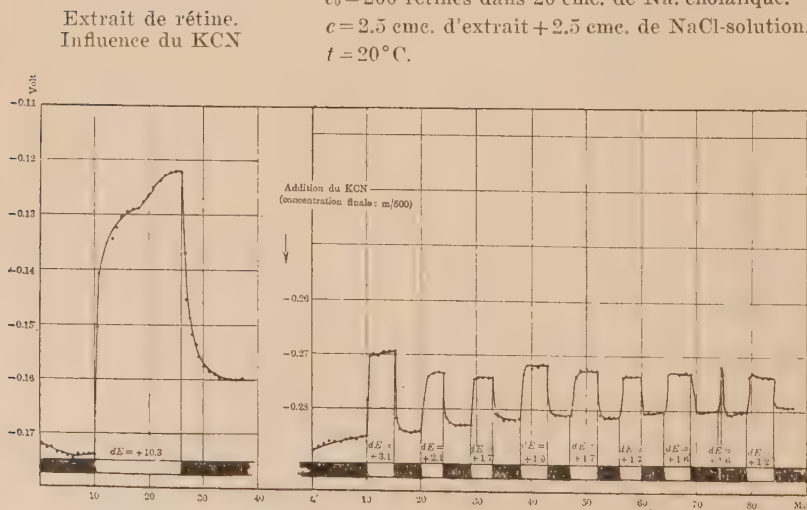


Fig. 9.

 $c_0 = 200$ rélines dans 20 cme. de Na. cholalique. $c = 2.5$ cme. d'extrait + 2.5 cme. de NaCl-solution. $t = 20^\circ \text{C}$ 

BIBLIOGRAPHIE.

- Aubel, E., Aubertin, E. et Mauriac, P. (1928): Sur le potentiel d'oxydo-réduction des cellules de mammifères. *C. r. Soc. Biol.* **98**, 589.
- Clark, W. M. (1923): *Determination of hydrogenion*. 2nd Ed.
- Clark, W. M.: *Studies on oxydation-reduction*. U. S. Publ. H. Reports. (1923) 443, 666, 933; (1925) 1131; (1924) 381, 804.
- Dixon, M. (1927): On the mechanism of oxydation-reduction potential. *Proc. of the roy. soc. ser. B. Bd. 101, No. B. 707*, s. 57.
- Hayashi, K. (1926): Sur la production d'acide phosphorique à la rétine par la lumière. Conférence faite devant la 30e assemblée de la Société japonaise d'Ophtalmologie.
- Hertel, E. (1904): Ueber Beeinflussung des Organismus durch Licht, speziell durch die chemisch wirksamen Strahlen. *Zeitschr. f. allg. Physiol.* IV. 1. s. 1.
- Jesioneck (1910): *Lichtbiologie*.
- Michaelis, L. (1922): *Wasserstoffionenkonzentration*. 1. 2. Aufl. s. 258.
- Michaelis, L. (1929): *Oxydations-Reductionspotentiale*. Berlin.
- Nakashima, M. (1927): Sur la photochimie du pourpre rétinien. Conférence faite devant la 31e assemblée de la Société japonaise d'Ophtalmologie.
- Needham, J. and Needham, D. M. (1926): The oxydation-reduction potential of protoplasma. *Bd. 1, H. 2*, s. 255.
- Nernst (1926): *Theoretische Chemie*. 11/15 Aufl.
- Raokine, L. and Wurmser (1927): On the intracellular oxydation-reduction potential. *Proc. of the roy. Soc. ser. B. Bd. 102, No. B. 715*, s. 128.
- Warburg, O. (1926): Ueber den Stoffwechsel der Tumoren.
- Warburg, O. (1928): Ueber die Katalytische Wirkung lebendiger Substanzen.

ÜBER DEN EINFLUSS DER ELECTROLYTEN AUF DIE PHOSPHOMONOESTERASE UND PYROPHOSPHATASE.

VON

SANMATSU MUNEMURA.

*(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen
Akademie zu Chiba. Director: Prof. S. Akamatsu.)*

(Eingegangen am 10. Februar 1933)

Um die Bedeutung des Phosphors in biologischen Prozessen besonders bei Kohlenhydratumsatz aufzuklären, wurden bisher schon viele Experimente über den Einfluss der Chemikalien auf die Phosphatasenwirkung ausgeführt. Wir verzichten darauf, die früheren Angaben in der Literatur einzeln zu diskutieren, erstens wegen der Raumersparnis und zweitens darum, weil es sich bei solchen Experimenten fast ausschliesslich um eine Art Phosphatase, den dritten Typ Phosphomonoesterase, handelte. Durch die systematischen Untersuchungen im hiesigen Institut wissen wir, dass in der Natur drei Arten Phosphomonoesterase und Pyrophosphatase vorhanden sind. Die Substrate von beiden Fermenten sind selbstverständlich die Phosphorsäuremonoester resp. das Pyrophosphat. Der Auf- und Abbau dieser Phosphorverbindungen in Organismen bildet eine Stufenreaktion bei dem Zuckerumsatz, und die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist ein bedingender Faktor für die umzusetzende Zuckermenge. Auf Anregung von Prof. Akamatsu hat der Verfasser den Einfluss der Elektrolyten auf die Phosphomonoesterase und die Pyrophosphatase untersucht, um damit zu den analytischen Studien der Phosphatasenwirkung bei Stoffwechsel beizutragen. Der Verfasser legte besonderes Gewicht auf den Vergleich des Verhaltens der verschiedenen Phosphomonoesterasen und Pyrophosphatasen gegen verschiedene Elektrolyten. Da der Zweck der vorliegenden Experimente die gründliche Untersuchung der Beeinflussbarkeit der Phosphatase durch zugesetzte Chemikalien ist, muss die hergestellte Fermentlösung möglichst frei von Elek-

trolyten und kolloidalen Begleitsubstanzen sein, was durch das im hiesigen Institut übliche Autolysen- und Dialysen-Verfahren ermöglicht wurde. Dieser Gesichtspunkt wurde leider bisher von vielen Autoren nicht berücksichtigt, indem sie einfach den Organbrei, Presssaft oder höchstens das Autolysat, aber ohne nachherige Dialyse anwandten. Man kann wohl erwarten, dass die so hergestellte Fermentlösung reich an Substanzen ist, die in Form von Ionen oder Kolloiden auf die Phosphatasenaktivität beträchtliche Einflüsse auszuüben vermögen. Unsere Fermentlösungen waren dagegen fast frei von Elektrolyten und sehr arm an Eiweiss; sie trübten sich fast nicht bei Trichloressigzusatz und zeigten keine Verfärbung durch das kolorimetrische Molybdänreagens.

Schweinenieren- und Reiskleienfermentlösungen wurden somit in oben erwähnter Weise vorbereitet. Das dialysierte Nierenautolysat enthält die Phosphomonoesterase vom ersten (pH-Optimum 3) und dritten Typ (pH-Optimum 9) und die Pyrophosphatase auch vom ersten (pH-Optimum 4) und dritten Typ (pH-Optimum 9). Darüber wurde schon von Kurata (1931) und Hori (1932) berichtet. Die Phosphomonoesterase vom zweiten Typ (pH-Optimum 5.6) wurde von Hori in Erythrozyten nachgewiesen, obwohl das Vorkommen dieses Ferments in tierischen Organen, ausser im Blut, noch nicht bekannt ist. Aber da man nach der Untersuchung von Uzawa (1932) weiss, dass der Reiskleienextrakt reichliche Monoesterase vom zweiten Typ enthält, wurde die dialysierte Reiskleienlösung statt tierischen Ferments gebraucht. Diese pflanzliche Fermentlösung enthält nach Takahashi (1932) ausserdem eine Pyrophosphatase vom zweiten Typ (pH-Optimum 5-6): Die Existenz dieses Typs Pyrophosphatase in der tierischen Welt ist noch nicht bewiesen, doch wohl zu erwarten. Was für eine physiologische Bedeutung man den einzelnen Typen der beiden Fermente zuschreiben darf, bleibt vorläufig noch eine ungelöste Frage, aber der Verfasser glaubt, dass die vorliegenden Experimente über Elektrolytenwirkung im differenzierenden Sinne zur Lösung beitragen werden. Die geprüften Salze waren Magnesiumchlorid, Calciumchlorid, Natriumfluorid, Arsenat, Phosphat, Sulfat, Molybdat und Oxalat. Mit jedem Typ der Fermente und mit

jedem Salz wurden Versuche unter Pufferung bei verschiedenen PH ausgeführt und jedesmal Kontrollversuche angestellt, weil die Veränderung der Fermentaktivität während des Aufbewahrens der Fermentlösung im Eisschrank nicht ganz ausgeschlossen werden kann. PH wurde selbstverständlich gleich nach der Anstellung jedes Versuchs elektrometrisch bestimmt. Erst unter der Versuchsanordnung, nach der die vorliegenden Experimente ausgeführt wurden, kann man etwas Exaktes über den Elektrolyten-einfluss sagen.

Die aktivierende Wirkung des Magnesiums wurde zuerst von Erdtman (1928) gefunden und von vielen Seiten bestätigt. Es handelt sich dabei aber um den dritten Typ der Phosphomonoesterase. Die grosse Rolle dieses Ions bei Hexosenabbau, die von Euler (1931) an der alkoholischen Gärung und von Lohman (1931) an der Milchsäurebildung im Muskel bewiesen wurde, in Betracht ziehend, soll untersucht werden, wie dieses Ion die einzelnen Typen von Phosphomonoesterase und Pyrophosphatase beeinflusst. Der dritte Typ der Phosphomonoesterase wurde, wie von Vorgängern angegeben, durch Magnesium sehr stark aktiviert. Dies war auch der Fall bei dem zweiten Typ der Monoesterase. Dagegen wurde der erste Typ der Monoesterase fast nicht beeinflusst. Der erste und zweite Typ Pyrophosphatase blieb von Magnesium unbeeinflusst und der dritte Typ wurde sogar gehemmt. Das Calciumion übte, dem Magnesium entgegengesetzt, fast keinen Einfluss auf alle Typen von Monoesterase und Pyrophosphatase aus. Die Wirkung des Fluorions wurde früher von Inouye (1929) untersucht. Es handelte sich aber um einen Versuch mit der Takaphosphomonoesterase, die nach der jetzigen Klassifikation dem ersten Typ angehört. Wie das Takaferment von Inouye wurde der erste Typ Monoesterase der Niere durch Fluorid stark gehemmt. Dies war auch der Fall bei dem ersten Typ der Pyrophosphatase. Bei dem zweiten Typ von Monoesterase und Pyrophosphatase verminderte sich die Hemmung des Fluorions beträchtlich, obwohl bei PH 3-4 noch eine enorme Hemmung zu beobachten war. Der dritte Typ der beiden Fermente wurde unerwarteterweise durch Fluorid fast nicht beeinflusst. Fluorid gehört be-

kanntlich zu den Giften, welche die Glykolyse beeinflussen. Wenn man die Beeinflussungsweise dieses Salzes der des Magnesiumions, des Glykolysenaktivators, gegenüberstellt, merkt man bei dem ersteren die Beschleunigung der Wirkung des dritten und zweiten Typs der Monoesterase und bei dem letzteren die Hemmung des ersten und zweiten Typs von Monoesterase und Pyrophosphatase.

Arsenat ist ein anderes Gift für die Glykolyse. Dieses Anion hemmte sehr beträchtlich alle Typen der Phosphomonoesterase, was gegenüber der beschleunigenden Wirkung des Magnesiumions, des Glykolysenaktivators, auf den dritten und zweiten Typ des betreffenden Ferments als sehr interessant zu erwähnen ist. Der dritte Typ der Pyrophosphatase wurde durch Arsenat stark, die anderen beiden aber weit geringer gehemmt. Man kann also im grossen und ganzen sagen, dass unter den Glykolysengiften das Fluorid die Phosphatasenwirkung an der sauren Seite des Neutralpunkts hemmt, das Arsenat dagegen sein Hemmungsvermögen in dem alkalischen Medium entfaltet. Sulfat und Oxalat hemmen den ersten und dritten Typ der Phosphomonoesterase. Die Hemmung ist besonders stark bei dem Oxalat. Der zweite Typ der Monoesterase wird erst bei höherer Konzentration der Salze gehemmt. Die beiden Salze hemmen die Pyrophosphatase in derselben Weise, die hemmende Wirkung des Oxalats ist nämlich bei dem ersten und dritten Typ besonders auffallend.

Die Wirkung des Phosphats auf die Phosphomonoesterase wurde von Martland und Robison(1927) und später sehr genau von Jakobsohn(1932) untersucht. Durch das vorliegende Experiment wurde weiter bestätigt, dass alle Typen von Phosphomonoesterase und Pyrophosphatase mehr oder weniger von Phosphat, dem Spaltprodukt der Substrate, gehemmt werden. Es ist hinzuzufügen, dass Molybdat fast in gleicher Weise wie Fluorid auf die Phosphomonoesterase und Pyrophosphatase wirkt. Der dritte Typ der beiden Fermente bleibt unbeeinflusst, aber der erste und zweite wird stark gehemmt. Besonders auffallend ist in diesem Fall die Herabsetzung der Wirkung des zweiten Typs sowohl der Monoesterase als auch der Pyrophosphatase.

Die Wirkung der Chemikalien auf Phosphatase ist also sehr

mannigfaltig. Man hat wohl bisher über eine beschleunigende oder hemmende Wirkung irgendeines Salzes gesprochen, aber nicht immer genügend eingehend. Es muss nämlich dabei angegeben werden, um welchen Typ der Phosphatase, und zwar der Phosphomonoesterase oder Pyrophosphatase es sich handelt. Man weiss vorläufig nicht, welche biologische Rolle die verschiedenen Typen der Phosphatase im Organismus spielen, und auch nicht, welcher Typ der Phosphatase an dem Chemismus der Glykolyse teilnimmt. Die Beeinflussbarkeit der Glykolyse durch die Chemikalien in Betracht ziehend, dürfte das Ergebnis der vorliegenden Experimente zum analytischen Studium des Zuckeraabbaus beitragen.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Fermentlösungen: Das Schweinenieren-Autolysat wurde nach der Vorschrift von Asakawa (1928) und das Reiskleienextrakt nach Uzawa (1932) hergestellt und gegen destilliertes Wasser gründlich dialysiert, bis kolorimetrisch kein anorganischer Phosphor mehr nachweisbar war. Die Nierenfermentlösung enthält den ersten und dritten Typ der Phosphomonoesterase und dieselben Typen der Pyrophosphatase. Die Kleienfermentlösung enthält dagegen den zweiten Typ der Phosphomonoesterase und der Pyrophosphatase. Die Isolierung der einzelnen Fermente aus den betreffenden Fermentlösungen wurde absichtlich nicht ausgeführt, weil der Verfasser glaubte, dass die durch das Adsorptionsverfahren stattfindende Veränderung des Begleitstoffgehalts in den Fermentlösungen unzweckmässig das richtige Urteil für den gegenseitigen Vergleich der Beeinflussbarkeit durch Elektrolyten stören könnte.

Pufferlösungen: $M/10$ Glykokoll-HCl, $M/2$ Acetatessigsäure und $M/10$ Glykokoll-NaOH. P_H -Bestimmung elektrometrisch, aber bei Arsenat- und Molybdatzusatz nach Indikatormethode.

Zusammensetzung der Versuchslösungen:

I. Bei Phosphomonoesterasenversuch:

$M/100$ Natrium Glycerophosphat	5 ccm
Puffer	10 „
Salzlösung	5 „
Fermentlösung	5 „

II. Bei Pyrophosphatasenversuch :

M/200 Natrium Pyrophosphat	5 cem
Puffer	10 „
Salzlösung	5 „
Fermentlösung	5 „

Bei Kontrollversuchen statt Salzlösung das gleiche Volumen Wasser. Um dem erwarteten PH-Wert möglichst nahe zu kommen, war es bei Oxalat und Phosphat bequem, das primäre Salz bei den Versuchen in saurer Reaktion und das sekundäre Salz bei den Versuchen in alkalischer Reaktion zu gebrauchen. Trotzdem war bei diesen und auch bei anderen Salzen die Anstellung der gleichen PH-Werte in den entsprechenden Lösungen der Haupt- und Kontrollversuche sehr schwer auszuführen. Die Kurve des PH-Hydrolysengrades im Koordinatensystem lässt klar erkennen, wie sich das Resultat bei irgendeinem Salzzusatz zu dem der Kontrolle verhält.

Die Versuche wurden bei 37°C ausgeführt. Bestimmung des Phosphors kolorimetrisch nach Briggs. Da die Fermentlösungen a priori phosphorfrei waren, ergab der kolorimetrisch gemessene Phosphor gleich die abgespaltene Orthophosphorsäure. Bei den Versuchen mit Phosphatzusatz wurde die primär vorhandene P-Menge abgezogen und in den Tabellen angegeben. Beim Vorhandensein von Arsenat war die Phosphorbestimmung nicht so einfach auszuführen, wie von Braunstein(1932) und Morgulis und Pinto(1932) angegeben wurde. In dem vorliegenden Versuch wurde die Ermittlung wie folgt ausgeführt. Man leitet Schwefelwasserstoff in das Trichloressigsäure-Filtrat, versetzt nach einer Stunde mit einer kleinen Menge aktivierter Kohle und filtriert durch trockenes Papier. Damit kann eine klare und farblose Lösung erhalten werden. Man treibt dann den Schwefelwasserstoff durch CO₂-Durchleitung aus und bestimmt in dieser Lösung kolorimetrisch in üblicher Weise den anorganischen Phosphor. Nach dieser Methode kann man das Arsenat vollständig entfernen und am Gemisch von Arsenat und Phosphat das letztere quantitativ bequem bestimmen. In den folgenden Tabellen ist die nachgewiesene Phosphormenge in mg für 2.5 cem Versuchslösung

berechnet angegeben. Die Konzentration der Elektrolyte bedeutet die Endkonzentration in den Versuchslösungen.

ERGEBNISSE.

I. Versuch mit MgCl_2 .

A. I. Typ Phosphomonoesterase.

a) $M/50 \text{ MgCl}_2$.

PH	3.00	3.21	3.86	4.89	5.80
2 Stdn.	0.0155	0.0283	0.0360	0.0368	0.0276

b) $M/500 \text{ MgCl}_2$.

PH	3.03	3.20	3.88	4.86	5.72
2 Stdn.	0.0326	0.0391	0.0443	0.0368	0.0327

c) $M/5,000 \text{ MgCl}_2$.

PH	3.00	3.20	3.89	4.90	5.81
2 Stdn.	0.0345	0.0407	0.0452	0.0391	0.0328

d) $M/50,000 \text{ MgCl}_2$.

PH	3.03	3.24	3.93	4.94	5.86
2 Stdn.	0.0406	0.0459	0.0494	0.0466	0.0360

Kontrolle.

PH	2.90	3.20	3.96	4.91	5.82
2 Stdn.	0.0379	0.0443	0.0433	0.0346	0.0285

B. II. Typ Phosphomonoesterase.

a) $M/50 \text{ MgCl}_2$.

PH	2.92	3.95	4.90	5.59	5.90	6.81	7.78	8.35
2 Stdn.	0.0277	0.0563	0.0759	0.0816	0.0816	0.0613	0.0272	0.0218

b') $M/500 \text{ MgCl}_2$.

PH	2.95	3.92	4.86	5.62	5.93	6.75	7.78	8.45
2 Stdn.	0.0386	0.0583	0.0800	0.0937	0.0875	0.0659	0.0210	0.0170

c') $M/5,000 \text{ MgCl}_2$.

PH	2.96	3.90	4.97	5.62	5.94	6.73	7.89	8.51
2 Stdn.	0.0305	0.0521	0.0731	0.0816	0.0800	0.0618	0.0214	0.0139

d') $M/50,000 \text{ MgCl}_2$.

PH	3.00	3.95	4.90	5.62	5.85	6.78	7.95	8.50
2 Stdn.	0.0270	0.0401	0.0666	0.0769	0.0769	0.0566	0.0195	Spur

Kontrolle.

PH	2.98	3.96	4.97	5.63	5.86	6.83	7.93	8.71
2 Stdn.	0.0259	0.0412	0.0666	0.0705	0.0705	0.0456	0.0160	Spur

C. III. *Typ Phosphomonoesterase.*a'') $M/50 \text{ MgCl}_2$.

PH	7.14	7.76	8.40	9.13	9.63	10.12	10.18
1 Stde.	0.0142	0.0330	0.0810	0.1027	0.0714	0.0178	0.0136

b'') $M/500 \text{ MgCl}_2$.

PH	7.10	7.87	8.66	9.34	10.07	10.59	11.14
1 Stde.	0.0184	0.0416	0.0833	0.0943	0.0699	0.0190	0

c'') $M/5,000 \text{ MgCl}_2$.

PH	7.13	8.18	8.71	9.33	9.90	10.72	11.32
1 Stde.	0.0095	0.0338	0.0777	0.0909	0.0681	0.0069	0

d'') $M/50,000 \text{ MgCl}_2$.

PH	7.19	8.24	8.82	9.36	9.94	10.77	11.32
1 Stde.	0.0075	0.0272	0.0560	0.0774	0.0628	0.0096	0

Kontrolle.

PH	6.85	8.10	8.84	9.28	9.88	10.60	11.20
1 Stde.	0.0096	0.0191	0.0481	0.0641	0.0633	0.0147	0

*D. I. Typ Pyrophosphatase.**M/500 MgCl₂.*

PH	3.03	3.95	4.95	6.02	6.83
2 Stdn.	0.0365	0.0568	0.0480	0.0240	0.0240

Kontrolle.

PH	3.08	4.03	5.02	6.03	7.23
2 Stdn.	0.0405	0.0591	0.0512	0.0307	Spur

*E. II. Typ Pyrophosphatase.**M/500 MgCl₂.*

PH	3.02	4.03	5.04	6.08	6.86	8.09
2 Stdn.	0.0157	0.0396	0.0546	0.0585	0.0436	0.0115

Kontrolle.

PH	2.93	3.95	4.96	5.98	6.83	8.09
2 Stdn.	0.0126	0.0371	0.0558	0.0648	0.0600	0.0196

*F. III. Typ Pyrophosphatase.**M/500 MgCl₂.*

PH	8.23	9.02	9.95
2 Stdn.	0.0512	0.0219	Spur

Kontrolle.

PH	8.26	8.98	10.00
2 Stdn.	0.0476	0.0591	Spur

II. Versuch mit CaCl_2 .A. I. *Typ Phosphomonoesterase.**M/50* CaCl_2 .

PH	2.95	3.20	3.85	4.91	5.81
2 Stdn.	0.0203	0.0290	0.0428	0.0430	0.0348

Kontrolle.

PH	2.90	3.20	3.96	4.91	5.82
2 Stdn.	0.0379	0.0433	0.0443	0.0346	0.0285

B. II. *Typ Phosphomonoesterase.**M/50* CaCl_2 .

PH	2.98	3.91	4.90	5.61	5.86	6.75	7.84	8.50
2 Stdn.	0.0250	0.0473	0.0660	0.0750	0.0705	0.0552	0.0250	Spur

Kontrolle.

PH	2.98	3.96	4.97	5.63	5.86	6.83	7.93	8.71
2 Stdn.	0.0259	0.0412	0.0666	0.0705	0.0705	0.0456	0.0160	0

C. III. *Typ Phosphomonoesterase.**M/50* CaCl_2 .

PH	7.07	8.11	8.69	9.23	9.71	10.45	11.15
1 Stde.	0.0119	0.0200	0.0429	0.0769	0.0507	0.0142	0

Kontrolle.

PH	6.85	8.10	8.84	9.28	9.88	10.60	11.20
1 Stde.	0.0096	0.0191	0.0481	0.0641	0.0633	0.0147	0

D. I. *Typ Pyrophosphatase.**M/5,000* CaCl_2 .

PH	3.02	4.03	5.06	6.09	6.88
2 Stdn.	0.0352	0.0600	0.0545	0.0250	Spur

Kontrolle.

PH	3.08	4.03	5.02	6.03	7.23
2 Stdn.	0.0405	0.0591	0.0512	0.0307	Spur

*E. II. Typ Pyrophosphatase.**M/5,000 CaCl₂.*

PH	3.06	4.03	5.06	6.05	6.98	8.18
2 Stdn.	0.0171	0.0410	0.0571	0.0685	0.0558	0.0219

Kontrolle.

PH	2.93	3.95	4.96	5.98	6.83	8.09
2 Stdn.	0.0126	0.0371	0.0558	0.0648	0.0600	0.0196

*F. III. Typ Pyrophosphatase.**M/5,000 CaCl₂.*

PH	8.20	9.00	9.80
2 Stdn.	0.0520	0.0600	Spur

Kontrolle.

PH	8.18	8.86	9.95
2 Stdn.	0.0485	0.0600	Spur

III. Versuch mit NaF.

*A. I. Typ Phosphomonoesterase.*a) *M/50 Fluorid.*

PH	3.24	3.36	3.89	4.94	5.80
2 Stdn.	0	0	0	0	Spur

b) *M/500 Fluorid.*

PH	2.95	3.19	3.89	4.91	5.90
2 Stdn.	0	0	0	Spur	0.0100

Kontrolle.

PH	2.90	3.20	3.96	4.91	5.82
2 Stdn.	0.0379	0.0433	0.0443	0.0346	0.0285

B. II. Typ Phosphomonoesterase.

a') M/50 Fluorid.

PH	3.50	3.97	4.91	5.60	5.84	6.70	7.62	8.80
2 Stdn.	0	0	0.0250	0.0344	0.0396	0.0450	0.0185	Spur

b') M/500 Fluorid.

PH	2.97	3.93	4.93	5.62	5.87	6.72	7.81	8.40
2 Stdn.	0	0.0180	0.0382	0.0550	0.0594	0.0591	0.0189	Spur

Kontrolle.

PH	2.98	3.96	4.97	5.63	5.86	6.83	7.93	8.71
2 Stdn.	0.0259	0.0412	0.0666	0.0705	0.0705	0.0456	0.0160	0

C. III. Typ Phosphomonoesterase.

a'') M/50 Fluorid.

PH	6.72	8.09	8.54	9.26	9.81	10.50	11.07
1 Stde.	0.0106	0.0200	0.0406	0.0545	0.0419	0.0114	0

b'') M/500 Fluorid.

PH	6.79	8.01	8.66	9.31	9.88	10.67	11.35
1 Stde.	0.0133	0.0149	0.0396	0.0500	0.0362	Spur	0

Kontrolle.

PH	6.85	8.10	8.84	9.28	9.88	10.60	11.20
1 Stde.	0.0096	0.0191	0.0481	0.0641	0.0633	0.0147	0

*D. I. Typ Pyrophosphatase.**M/50 Fluorid.*

PH	3.72	4.01	5.03	6.04	6.87
2 Stdn.	0	0	0.0112	0.0118	Spur

Kontrolle.

PH	3.08	4.03	5.02	6.03	7.23
2 Stdn.	0.0405	0.0591	0.0512	0.0307	Spur

*E. II. Typ Pyrophosphatase.**M/50 Fluorid.*

PH	3.40	4.01	5.03	6.05	6.77	8.14
2 Stdn.	0	0	0.0101	0.0311	0.0480	0.0258

Kontrolle.

PH	2.93	3.95	4.96	5.98	6.83	8.09
2 Stdn.	0.0126	0.0371	0.0558	0.0648	0.0600	0.0196

*F. III. Typ Pyrophosphatase.**M/50 Fluorid.*

PH	8.09	8.88	9.75
2 Stdn.	0.0420	0.0610	Spur

Kontrolle.

PH	8.20	8.95	10.00
2 Stdn.	0.0500	0.0570	0

IV. Versuch mit Na_2HAsO_4 .*A. I. Typ Phosphomonoesterase.**a) M/500 Arsenat.*

PH	3.3	3.6	4.4	5.2	6.2
2 Stdn.	0.0130	0.0110	0.0102	0.0100	0.0112

b) *M*/5,000 Arsenat.

PH	3.1	3.2	4.4	5.0	6.0
2 Stdn.	0.0290	0.0315	0.0300	0.0273	0.0229

c) *M*/50,000 Arsenat.

PH	3.1	3.3	4.4	5.0	6.2
2 Stdn.	0.0321	0.0367	0.0399	0.0340	0.0283

Kontrolle.

PH	2.93	3.21	3.88	4.85	5.90
2 Stdn.	0.0340	0.0435	0.0440	0.0336	0.0266

*B. II. Typ Phosphomonoesterase.*a') *M*/500 Arsenat.

PH	3.3	4.1	5.1	5.9	6.2	7.0	7.9	8.7
2 Stdn.	0.0146	0.0186	0.0208	0.0160	0.0162	Spur	0	0

b') *M*/5,000 Arsenat.

PH	3.0	4.0	5.0	5.7	6.1	6.9	7.9	8.8
2 Stdn.	0.0243	0.0370	0.0491	0.0428	0.0422	0.0236	0.0111	Spur

c') *M*/50,000 Arsenat.

PH	3.0	4.0	5.0	5.6	6.1	6.9	8.1	8.8
2 Stdn.	0.0268	0.0483	0.0718	0.0705	0.0693	0.0489	0.0147	Spur

Kontrolle.

PH	2.98	3.96	4.97	5.63	5.86	6.83	7.93	8.41
2 Stdn.	0.0259	0.0412	0.0666	0.0705	0.0705	0.0456	0.0160	Spur

*C. III. Typ Phosphomonoesterase.*a'') *M*/500 Arsenat.

PH	7.0	8.2	8.6	9.4	9.88	10.29	10.90
1 Stde.	Spur	Spur	Spur	Spur	Spur	Spur	0

b'') *M*/5,000 Arsenat.

PH	7.0	8.2	8.8	9.4	9.88	10.45	11.15
1 Stde.	Spur	0.0121	0.0130	0.0175	0.0196	0.0107	0

c'') *M*/50,000 Arsenat.

PH	7.0	8.2	8.8	9.4	9.82	10.61	11.25
1 Stde.	Spur	0.0132	0.0136	0.0340	0.0316	Spur	0

Kontrolle.

PH	6.83	8.08	8.79	9.30	9.93	10.54	11.30
1 Stde.	Spur	0.0150	0.0344	0.0479	0.0355	Spur	0

*D. I. Typ Pyrophosphatase.**M*/500 Arsenat.

PH	3.3	4.4	5.2	6.4	7.3
2 Stdn.	0.0444	0.0510	0.0444	0.0310	Spur

Kontrolle.

PH	3.08	4.03	5.02	6.03	7.23
2 Stdn.	0.0405	0.0591	0.0512	0.0307	Spur

*E. II. Typ Pyrophosphatase.**M*/500 Arsenat.

PH	3.3	4.4	5.1	6.4	7.3	8.2
2 Stdn.	0.0218	0.0347	0.0400	0.0421	0.0405	0.0162

Kontrolle.

PH	2.93	3.95	4.96	5.98	6.83	8.09
2 Stdn.	0.0126	0.0371	0.0558	0.0648	0.0600	0.0196

*F. III. Typ Pyrophosphatase.**M/500* Arsenat.

PH	8.2	9.1	9.8
2 Stdn.	0.0155	Spur	0

Kontrolle.

PH	8.18	8.86	9.95
2 Stdn.	0.0485	0.0600	Spur

V. Versuch mit KH_2PO_4 od. Na_2HPO_4 .*A. I. Typ Phosphomonoesterase.*a) *M/500* Phosphat.

PH	2.88	3.19	3.93	4.88	5.81
2 Stdn.	0.0017	0.0079	0.0071	0.0071	0.0107

b) *M/5,000* Phosphat.

PH	2.98	3.20	3.95	4.93	5.80
2 Stdn.	0.0205	0.0220	0.0216	0.0231	0.0178

Kontrolle.

PH	2.94	3.21	3.94	4.91	5.86
2 Stdn.	0.0400	0.0428	0.0409	0.0362	0.0300

*B. II. Typ Phosphomonoesterase.*a') *M/500* Phosphat.

PH	2.83	3.85	4.90	5.61	5.83	6.73	7.85	8.52
2 Stdn.	0.0032	0.0084	0.0240	0.0240	0.0218	0.0110	0.0062	0.0062

b') M/5,000 Phosphat.

PH	3.03	3.96	4.93	5.62	5.88	6.75	7.96	8.65
2 Stdn.	0.0171	0.0297	0.0486	0.0530	0.0511	0.0315	0.0090	0.0045

Kontrolle.

PH	2.98	3.96	4.97	5.63	5.86	6.83	7.93	8.41
2 Stdn.	0.0259	0.0412	0.0666	0.0705	0.0705	0.0456	0.0160	Spur

C. III. Typ Phosphomonoesterase.

a'') M/500 Phosphat.

PH	6.65	7.86	8.46	9.12	9.65	10.56	11.23
1 Stde.	0.0031	0.0018	0.0068	0.0179	0.0160	-0.0074	-0.0014

b'') M/5,000 Phosphat.

PH	6.74	7.95	8.54	9.19	9.55	10.60	11.18
1 Stde.	0.0061	0.0215	0.0436	0.0519	0.0422	0.0085	0.0061

Kontrolle.

PH	6.75	7.98	8.54	9.17	9.60	10.48	11.38
1 Stde.	0.0126	0.0439	0.0736	0.0863	0.0736	0.0171	0

D. I. Typ Pyrophosphatase.

M/500 Phosphat.

PH	2.86	3.85	4.96	5.97	6.78
2 Stdn.	0.0317	0.0317	0.0284	0.0144	0.0111

Kontrolle.

PH	3.08	4.03	5.02	6.03	7.23
2 Stdn.	0.0405	0.0591	0.0512	0.0307	Spur

*E. II. Typ Pyrophosphatase.**M/500 Phosphat.*

PH	3.03	4.05	5.05	6.07	6.97	8.15
2 Stdn.	0.0183	0.0268	0.0391	0.0550	0.0391	0.0219

Kontrolle.

PH	2.93	3.95	4.96	5.98	6.83	8.09
2 Stdn.	0.0126	0.0371	0.0558	0.0648	0.0600	0.0196

*F. III. Typ Pyrophosphatase.**M/500 Phosphat.*

PH	8.28	9.03	10.00
2 Stdn.	0.0510	0.0490	0.0111

Kontrolle.

PH	8.18	8.86	9.95
2 Stdn.	0.0485	0.0600	Spur

VI. Versuch mit Na_2SO_4 .*A. I. Typ Phosphomonoesterases.*a) *M/50 Sulfat.*

PH	3.05	3.24	3.93	4.93	5.86
2 Stdn.	0	0	0.0144	0.0266	0.0247

b) *M/500 Sulfat.*

PH	2.95	3.18	3.94	4.93	5.86
2 Stdn.	0.0142	0.0176	0.0247	0.0370	0.0300

c) *M/5,000 Sulfat.*

PH	2.93	3.19	3.94	4.93	5.88
2 Stdn.	0.0266	0.0308	0.0351	0.0346	0.0323

Kontrolle.

PH	2.94	3.21	3.94	4.91	5.86
2 Stdn.	0.0400	0.0428	0.0409	0.0362	0.0300

B. II. Typ Phosphomonoesterase.

a') M/50 Sulfat.

PH	3.01	3.93	4.91	5.59	5.87	6.74	7.90	8.50
2 Stdn.	0	0.0250	0.0674	0.0800	0.0800	0.0585	0.0247	Spur

b') M/500 Sulfat.

PH	2.98	3.95	4.93	5.60	5.85	6.80	7.96	9.40
2 Stdn.	0.0159	0.0431	0.0678	0.0827	0.0765	0.0504	0.0194	0.0140

c') M/5,000 Sulfat.

PH	2.94	3.90	4.88	5.60	5.88	6.85	7.94	8.51
2 Stdn.	0.0239	0.0465	0.0674	0.0685	0.0685	0.0500	0.0256	0.0178

Kontrolle.

PH	2.98	3.91	4.97	5.63	5.86	6.83	7.93	8.41
2 Stdn.	0.0259	0.0412	0.0666	0.0705	0.0705	0.0456	0.0160	Spur

C. III. Typ Phosphomonoesterase.

a'') M/50 Sulfat.

PH	6.73	7.87	8.58	9.14	9.77	10.55	11.35
1 Stde.	0.0115	0.0121	0.0281	0.0360	0.0295	0.0132	0

b'') M/500 Sulfat.

PH	6.83	7.91	8.53	9.16	9.77	10.53	11.35
1 Stde.	0.0117	0.0218	0.0360	0.0473	0.0430	0.0140	0

e'') M/5,000 Sulfat.

PH	6.72	7.91	8.65	9.14	9.74	10.40	11.25
1 Stde.	0.0193	0.0200	0.0480	0.0605	0.0533	0.0182	0

Kontrolle.

PH	6.75	7.98	8.54	9.17	9.60	10.48	11.38
1 Stde.	0.0126	0.0436	0.0736	0.0863	0.0739	0.0171	0

D. I. Typ Pyrophosphatase.

M/50 Sulfat.

PH	2.94	3.96	5.00	6.01	6.82
2 Stdn.	0.0200	0.0468	0.0452	0.0225	Spur

Kontrolle.

PH	3.08	4.03	5.02	6.03	7.23
2 Stdn.	0.0405	0.0591	0.0512	0.0307	Spur

E. II. Typ Pyrophosphatase.

M/50 Sulfat.

PH	2.98	3.92	5.02	6.00	6.78	8.15
2 Stdn.	0.0103	0.0295	0.0571	0.0714	0.0594	0.0206

Kontrolle.

PH	2.93	3.95	4.96	5.98	6.83	8.09
2 Stdn.	0.0126	0.0371	0.0558	0.0648	0.0600	0.0196

F. III. Typ Pyrophosphatase.

M/50 Sulfat.

PH	8.29	8.99	10.05
2 Stdn.	0.0500	0.0461	Spur

Kontrolle.

PH	8.26	8.98	10.00
2 Std.n.	0.0476	0.0591	Spur

VII. Versuch mit $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$.

A. I. Typ Phosphomonoesterase.

M/500 Molybdat.

PH	3.0	3.1	4.0	5.0	6.0
2 Std.n.	0	0	0	0	Spur

Kontrolle.

PH	2.93	3.19	3.95	4.91	5.86
2 Std.n.	0.0391	0.0473	0.0375	0.0346	0.0270

B. II. Typ Phosphomonoesterase.

M/500 Molybdat.

PH	3.0	4.0	5.0	5.6	6.0	6.2	7.6
2 Std.n.	0	0	Spur	Spur	Spur	Spur	0

Kontrolle.

PH	2.96	3.94	4.95	5.62	5.85	6.82	7.97	8.56
2 Std.n.	0.0196	0.0361	0.0571	0.0615	0.0571	0.0410	0.5157	Spur

C. III. Typ Phosphomonoesterase.

M/500 Molybdat.

PH	6.2	7.6	9.2	9.6	9.86	9.93
1 Std.n.	0	0.0389	0.0691	0.0694	0.0524	0.0458

Kontrolle.

PH	6.76	7.92	8.46	9.10	9.54	10.40	11.80
1 Std.n.	0.0087	0.0346	0.0764	0.0869	0.0774	0.0153	0

*D. I. Typ Pyrophosphatase.**M/500 Molybdat.*

PH ₁	3.0	4.0	5.0	6.1	6.6
2 Stdn.	0	0	0.0161	0.0184	0.0126

Kontrolle.

PH	3.08	4.03	5.02	6.03	7.23
2 Stdn.	0.0405	0.0591	0.0512	0.0307	Spur

*E. II. Typ Pyrophosphatase.**M/500 Molybdat.*

PH	3.0	4.0	5.0	6.2	6.6	8.0
2 Stdn.	0	0	0	Spur	Spnr	0

Kontrolle.

PH	2.93	3.95	4.96	5.98	6.83	8.09
2 Stdn.	0.0121	0.0371	0.0558	0.0648	0.0600	0.0196

*F. III. Typ Pyrophosphatase.**M/500 Molybdat.*

PH	8.35	9.01	9.77
2 Stdn.	0.0520	0.0575	Spur

Kontrolle.

PH	8.20	8.95	10.00
2 Stdn.	0.0500	0.0575	Spur

VIII. Versuch mit NaHC_2O_4 od. $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$.*A. I. Typ Phosphomonoesterase.**M/50 Oxalat.*

PH	2.99	3.30	3.85	4.88	5.47
2 Stdn.	0	0	0	0	Spur

Kontrolle.

PH	2.97	3.27	3.90	4.90	6.03
2 Stdn.	0.0375	0.0450	0.0450	0.0346	0.0276

*B. II. Typ Phosphomonoesterase.**M/50 Oxalat.*

PH	2.85	4.09	5.04	5.65	5.90	6.86	8.20
2 Stdn.	0	0.0180	0.0264	0.0398	0.0386	0.0240	Spur

Kontrolle.

PH	3.00	3.95	5.00	5.65	6.05	6.85	8.17
2 Stdn.	0.0135	0.0250	0.0365	0.0432	0.0416	0.0269	Spur

*C. III. Typ Phosphomonoesterase.**M/50 Oxalat.*

PH	6.00	8.50	9.18	9.48	10.20	10.82
2 Stdn.	0	Spur	Spur	Spur	Spur	0

Kontrolle.

PH	6.83	8.27	9.16	9.45	10.24	10.86
2 Stdn.	Spur	0.0316	0.0774	0.0897	0.0736	0.0171

*D. I. Typ Pyrophosphatase.**M/50 Oxalat.*

PH	3.05	4.09	5.04	5.85	6.87
2 Stdn.	Spur	Spur	Spur	Spur	0

Kontrolle.

PH	3.08	4.03	5.02	6.03	7.23
2 Stdn.	0.0405	0.0591	0.0512	0.0307	Spur

*E. II. Typ Pyrophosphatase.**M/50 Oxalat.*

PH	2.90	3.90	5.06	6.10	7.01	8.30
2 Stdn.	0	0.0237	0.0659	0.0681	0.0600	0.0264

Kontrolle.

PH	2.93	3.95	4.96	5.98	6.83	8.09
2 Stdn.	0.0126	0.0371	0.0558	0.0648	0.0600	0.0196

*F. III. Typ Pyrophosphatase.**M/50 Oxalat.*

PH	8.26	9.10	10.00
2 Stdn.	0	Spur	0

PH	8.24	9.05	10.00
2 Stdn.	0.0485	0.0600	0

LITERATUR.

- Asakawa, K. (1928): Journ. of Biochem., **10**, 157.
 Braunstein, A. E. (1932): Journ. of Biolog. Chem., **98**, 379.
 Erdtman, H. (1928): Zeitschr. physiolog. Chem., **177**, 211.
 Euler und Nilsson (1931): Ztschr. physiolog. Chem., **200**, 1.
 Hummerberg (1927): Ztschr. physiolog. Chem., **185**, 123.
 Inouye, K. (1927): Journ. of Biochem., **7**, 433.
 Inouye, K. (1929): Journ. of Biochem., **10**, 395.
 Jenner, H. D. u. Kay, H. D. (1931): Journ. of Biolog. Chem., **93**, 733.
 Kurata, K. (1931): Journ. of Biochem., **14**, 25.
 Martland. und Robison (1927): Biochem. Journ., **21**, 665.
 Morgulis, S. u. Pinto, S. (1932): Journ. of Biolog. Chem., **98**, 385.
 Neuberg, C. u. Leibowitz, J. (1927): Biochem. Z., **191**, 460.
 Takahashi, H. (1932): Journ. of Biochem., **16**, 447.
 Uzawa, S. (1932): Journ. of Biochem., **15**, 1.

ON THE ACCURACY OF SOME CLINICAL METHODS OF ESTIMATING THE PROTEIN PRESENT IN THE URINE.

By

MIGIWA HORI.

*(From the 1st Division of the Institute of Physiology and the 2nd Clinic for
Internal Medicine, Kyoto Imperial University. Directors:
Prof. R. Shoji and Prof. I. Matsuo.)*

(Received for publication, February 17, 1933)

INTRODUCTION.

For the clinical purpose of estimating the protein present in a pathological urine, there are three methods, namely Esbach's, Tsuchiya's and Sueyoshi's. They are all identical in reading the volume of the protein which was precipitated after 24 hours, but differ on the reagent which causes the protein to precipitate. Inoue (1930) of our Institute, pointed out that the precipitation is not yet complete at that period, so that the reading is influenced by several conditions, such as, for example, the temperature and the specific gravity of the sample. So he ventured to apply to it Hirota's centrifuge method for blood cells, and modified the method as follows: A definite amount of a reagent, i.e. 2 cc. of Esbach's reagent, 2.2 cc. of Tsuchiya's or 2.1 cc. of Sueyoshi's, is put in a sedimentation tube designed by himself, which is sketched in the attached figure. The narrower part of it is 4.5 cm. long and 3 mm. bore, and the tube is graduated into 100 divisions. 2.50 cc. of urine are poured into it, mixed well, and then centrifuged for 10 minutes with a constant speed of more than 2500 revolutions per minute, by means of an electromotorical centrifuge with a radius of 13 cm. to the bottom of the revolving tube. The time of centrifuging is measured exactly from switching on to switching off. After the centrifuge has automatically stopped, the volume of the sediment, V_1 , is read. Again



Fig

the centrifuging is repeated for another 10 minutes, after which the volume, V_2 , is read as before. Then the net volume of the precipitates, V_∞ , is given by

$$V_\infty = \frac{10}{\frac{20}{V_2} - \frac{10}{V_1}} = \frac{V_1 V_2}{2V_1 - V_2}$$

Inoue also described the method of computing the factor, with which the value of V_∞ is to be multiplied, when it is desired to convert it to a figure of % protein in conformity with clinical usage. The factor differs naturally for each sedimentation tube according to its bore, and should be calibrated for each.

Inoue did not study which of the three kinds of reagents mentioned above gives the most accurate result. The aim of our present research is to examine them to see which is the best, when used in the ordinary way, as well as in Inouye's centrifuging method. For this purpose, an albuminuric urine was estimated, by these methods, and the results were checked by the analytical estimation of Abderhalden-Fodor's (1931) halfmicro-modification of the Kjeldahl method.

METHODS.

Albuminuric materials were collected from in-patients of Prof. Matsuo's clinic. The preparation of the three reagents, i.e. Esbach's, Tsuchiya's and Sueyoshi's, and also the procedure of estimation by precipitating the protein with one of these reagents, and by centrifuging are similar to those reported by Inoue, of which a brief description has already been given above in the introduction. More detailed remarks should be consulted by referring to his original paper. In our experiments, readings of the precipitate volume were taken 3 times successively after centrifuging at 10-minute intervals. With the third reading, any accidental error in the two previous readings can be checked, or more accurate data of V_∞ can be computed by the graphic method, applying Hirota's empirical equation,

$$\frac{t}{V_t} = a + bt$$

$$\text{and } V_{\infty} = \frac{1}{b}$$

Estimations were carried out at room temperature between 21–26°C.

Some remarks on carrying out the halfmicro-Kjeldahl estimation are here noted briefly.

Estimation of the protein content: The protein contained in the filtered urine was first precipitated with acetic acid, and then it was estimated by the halfmicro-Kjeldahl method after Abderhalden and Fodor (1931). The procedure is as follows: 5 cc. of filtered urine is put in a test tube of about 10 cc. content and, on heating it over a small flame, 3% acetic acid is added to it drop by drop, until no further precipitation occurs. The precipitate is collected on a N-free filter paper. The filtrate is treated again in the same manner and tested to see that no precipitate appears on heating. If it appears, it should be added to the precipitate on the filter paper. The precipitate is washed with warm distilled water until no trace of chlor is detected with a 2% AgNO_3 solution and HNO_3 . The precipitate, together with the paper, is transferred, without loss, to a 200 cc. Kjeldahl flask, and 5 cc. of pure concentrated H_2SO_4 , 1 cc. of a 100% CuSO_4 solution and about 0.2 g of K_2SO_4 powder are added to it. The flask is then heated over a flame, until the content becomes transparent and colourless, which indicates completeness of oxidation. Then the flask is cooled and the contents diluted with distilled water, and after the distillation equipment is adjusted, a sufficient amount of the saturated NaOH solution is added, and the distillation is carried out under an air passage which is previously washed through a H_2SO_4 solution. Ammonia is collected in excess of the 0.1N H_2SO_4 solution (a cc.), which is titrated subsequently with a 0.1N NaOH solution (b cc.) as usual, alizarin red being taken as indicator. The protein content of the urine is then given by

$$\frac{a-b}{5} \times 0.0014 \times 6.25 \times 100\%$$

RESULTS.

Accuracy of the original method: One and the same albuminuric urine was estimated by the three original methods, and the result was compared with that of the halfmicro-Kjeldahl estimation. Twenty cases were examined and the error of each estimation was calculated for each method. Data are given in the Protocol attached at the end of this paper. There was noticed a tendency to greater error when the material was rich in protein, though the proportion was not very good. So the percentage error against the observed value* was calculated of which the mean (m) of the 20 estimations for each method as well as its standard deviation (σ), is summarized as follows.

Esbach's reagent:	$m = -13.38$ $\sigma = 13.20 \pm 1.45$
Tsuchiya's reagent:	$m = + 3.52$ $\sigma = 10.55 \pm 1.16$
Sueyoshi's reagent:	$m = - 3.52$ $\sigma = 9.02 \pm 0.99$

The positive sign of the percentage error means that the observed value is higher than the Kjeldahl value, and the negative sign just the reverse. The error is the largest with Esbach's method, and the least with Sueyoshi's. The error, however, can be corrected by calibrating the graduation of the tube used. The accuracy of the method may rather be judged by the standard deviation, which indicates that Sueyoshi's method is the best, while Esbach's is the worst, though the differences between them are not very significant.

Accuracy of the centrifuge method: The same materials were estimated by means of Inoue's centrifuge method also, applying each of the three reagents mentioned above. In order to convert the V_{∞} value to the percentage protein, Inoue computed the factor, with which the V_{∞} should be multiplied. Naturally the factor differs according to the volume corresponding to the unit division

* Theoretically the percentage error should be computed against the Kjeldahl value, but for practical purposes it is better computed against the observed data.

of the sedimentation tube. We computed the same with our tube (1 division=3.2 cmm.) by the factor, $\frac{\text{Kjeldahl value in } \%}{V_{\infty} \text{ in division of the tube}}$, of which the average is as follows:

Factor for Esbach's reagent	0.111 ± 0.0014
„ „ Tsuchiya's reagent	0.119 ± 0.0018
„ „ Sueyoshi's reagent	0.259 ± 0.0030

Now, multiplying each V_{∞} with the corresponding factor, the error, i.e. the deviation of each observed protein content from the Kjeldahl value, was calculated for each estimation. It is obvious that the mean of these errors should be zero, but the standard

TABLE I.
Original Sedimentation Method.

No.	Kjeldahl estimation (%)	Sedimentation method (%)		
		Esbach	Tsuchiya	Sueyoshi
1	9.02	7.90	10.40	8.90
2	8.48	6.80	9.40	9.30
3	8.35	7.00	9.20	8.80
4	7.38	6.30	7.90	7.90
5	7.09	5.60	6.40	6.60
6	6.76	5.40	7.30	6.30
7	6.25	5.20	6.60	5.60
8	5.71	5.00	6.20	5.20
9	5.05	3.60	4.10	4.60
10	4.79	4.20	5.30	5.10
11	4.50	4.40	5.40	3.90
12	4.35	3.70	4.70	4.00
13	4.10	4.30	4.40	3.50
14	4.00	4.20	3.50	4.50
15	3.98	3.70	4.40	3.60
16	3.79	3.10	4.00	3.50
17	3.71	4.00	3.70	4.00
18	3.49	2.70	3.00	3.30
19	3.49	3.70	4.00	3.90
20	3.32	3.50	3.60	3.00

deviation has a certain value for each reagent, which gives in our estimations,

with Esbach's reagent	$\sigma = 8.68 \pm 0.95$
„ Tsuchiya's reagent	$\sigma = 9.36 \pm 1.02$
„ Sueyoshi's reagent	$\sigma = 7.38 \pm 0.81$

Here we see that Sueyoshi's is the best reagent while Tsuchiya's is the worst, and also that the three standard deviations are somewhat smaller than for the original methods. This latter means that the centrifuge method gives a more accurate result than the original one, though the superiority on this point is not very striking. The marked superiority of the centrifuge method still consists in the fact that the result is obtainable within 30 minutes.

In the above computations, the data obtained by Inouye's simplified procedure were treated. More accurate data obtained from the three readings give similar results, so that they are not discussed here, and the data are given in parentheses in Table II.

TABLE II.

No	Kjeldahl estimation (%)	Esbach's reagent		Tsuchiya's reagent		Sueyoshi's reagent	
		V_{∞} (in division)	$0.111 \times V_{\infty}$ (%)	V_{∞} (in division)	$0.119 \times V_{\infty}$ (%)	V_{∞} (in division)	$0.259 \times V_{\infty}$ (%)
1	9.02	83.4 (82.6)	9.26	80.0 (80.3)	9.52	36.4 (36.2)	9.43
2	8.48	71.0 (70.0)	7.88	72.4 (72.4)	8.62	35.0 (35.3)	9.07
3	8.35	80.3 (80.0)	8.91	77.0 (77.4)	6.16	33.7 (33.2)	8.73
4	7.38	70.2 (70.0)	7.79	63.2 (63.7)	7.52	31.3 (31.0)	8.11
5	7.09	58.0 (59.0)	6.44	53.2 (53.0)	6.33	29.5 (29.7)	7.64
6	6.76	60.2 (60.0)	6.68	56.4 (56.0)	6.71	25.0 (25.3)	6.48
7	6.25	55.6 (55.0)	6.17	51.0 (50.5)	6.07	23.0 (22.8)	5.96
8	5.71	55.3 (55.0)	6.14	51.8 (52.1)	6.16	20.7 (20.0)	5.36
9	5.05	36.7 (36.9)	4.07	36.6 (36.2)	4.36	18.2 (18.0)	4.71
10	4.79	43.1 (44.0)	4.78	40.8 (40.9)	4.86	19.4 (19.6)	5.02
11	4.50	49.1 (49.8)	5.45	45.0 (45.0)	5.36	15.7 (15.3)	4.07
12	4.35	38.1 (38.5)	4.23	36.5 (36.3)	4.34	15.0 (15.3)	3.89
13	4.10	41.6 (41.3)	4.62	40.3 (40.1)	4.80	14.4 (14.4)	3.73
14	4.00	35.2 (35.0)	3.91	27.0 (26.5)	3.21	16.3 (16.4)	4.22
15	3.98	35.4 (35.0)	3.93	33.8 (33.4)	4.00	15.7 (15.9)	4.07
16	3.79	32.5 (32.5)	3.61	30.7 (30.0)	3.65	14.0 (14.4)	3.63
17	3.71	34.2 (34.8)	3.80	31.0 (31.0)	3.69	14.7 (14.8)	3.81
18	3.49	30.2 (30.6)	3.35	27.8 (28.0)	3.31	13.3 (13.4)	3.44
19	3.49	33.3 (33.0)	3.70	28.6 (29.0)	3.40	16.3 (16.5)	4.22
20	3.32	33.2 (33.2)	3.69	29.7 (30.0)	3.53	12.2 (12.2)	3.16

V_{∞} in parentheses are those computed from three successive readings.

The % converted from them are omitted in this table.

CONCLUSIONS.

Of the three clinical methods of estimating the protein present in a pathological urine, namely, Esbach's, Tsuchiya's and Sueyoshi's, the last gives the most accurate result, the first the least. When Inoue's centrifuge method is applied to them, the accuracy is somewhat increased, and in this case, Sueyoshi's reagent is still the best, and Tsuchiya's, the worst.

REFERENCES.

- Abderhalden (1931): Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden.,
Abt I. Teil 3, 423.
Inoue, K. (1930): Journ. of Biochem., **12**, 7.

(Other references should be consulted in this article.)

BEITRÄGE ZUR RIVALTA'SCHEN REAKTION.

VON

S. KOZAWA, R. IWATSURU, UND T. ADACHI.

(Aus der II. Med. Klinik d. Kaiserl. Universität zu Osaka.)

(Eingegangen am 27. Februar 1933)

Zur klinischen Unterscheidung der Körperflüssigkeiten ist die Rivalta'sche Reaktion sehr wichtig, die bekanntlich darauf basiert, dass das Exsudat beim Abtropfen in essigsauer gemachtes Wasser im 200 ccm Messzylinder sich trübt und der sich dabei bildende Niederschlag bis zum Grunde des Messzylinders reicht, während im Gegensatz hierzu das Transsudat nur eine schwache Trübung aufweist, welche in Richtung zum unteren Pol gänzlich verschwindet. Der Eiweissgehalt des Exsudates ist angeblich über 4%, während der des Transsudates immer unter 2.5% bleibt. Reuss(1879), Runeberg(1881), Furukawa und Noda(1925), Hoffmann(1889) und Beranheim(1893) haben alle diese selbe Erscheinung einer genauen Untersuchung unterworfen und kamen zu denselben Schlüssen.

Hiruma(1923) von unserer Klinik prüfte die Rivalta'sche Reaktion in Hinsicht auf Elektrosmose und behauptet, dass das H^+ beim Exsudat $0.214 \cdot 10^{-2}$ (im Phosphatgemisch), $0.36 \cdot 10^{-4}$ (im Acetatgemisch), $1.13 \cdot 10^{-4}$ (im Citratgemisch) beträgt, während beim Transsudat das H^+ viel niedriger bleibt. Bei Überprüfung dieser Ergebnisse kamen wir zu der Annahme, dass hierbei der Eiweissgehalt unberücksichtigt geblieben ist. Wir haben deshalb zuerst nach unserer vorhergehenden Arbeit (Biochemische Zeitschrift, soeben erscheinen, 1933) das Eiweisspulver aus dem Exsudat, dem Transsudat sowie der Ödemflüssigkeit dargestellt und hiervon den Albumin/Globulin-Quotienten, die Aminosäurebestandteile etc. genau ermittelt.

Dann wiederholten wir die Untersuchungen der Rivalta'schen Reaktion, jedoch von einem anderen Gesichtspunkte ausgehend, indem wir das native Exsudat so stark mit physiologischer

Kochsalzlösung oder destilliertem Wasser verdünnten, bis wir mit der Kjeldahlmethode 1.0% Eiweissgehalt feststellen konnten; das Transsudat wurde im Faust-Heim'schen Apparat bei Zimmertemperatur schnell verdampft, bis ebenfalls eine 1%ige Eiweisslösung erzielt wurde.

Die Ergebnisse unserer Experimente sind die folgenden:

Aus der Tabelle I sieht man, dass das Eiweiss aus dem Exsudat in Bezug auf α -Aminosäuregehalt (81%), bzw. Tyrosin- (5,0%), Histidin- (1,1%) und Tryptophangehalt (1,4%) von dem des Transsudates nicht wesentlich abweicht.

In der Tabelle II kann man sich davon überzeugen, dass die Eiweissarten aus dem Exsudat, dem Transsudat sowie dem Gewebssaft in Hinsicht auf den Albumin-Globulinquotienten und den isoelektrischen Punkt kaum voneinander abweichende Werte besitzen, und zwar sind diese mit denen des Blutplasmas identisch.

Aus den Versuchen in Tabelle III geht hervor, dass die Rivalta'sche Reaktion beim eiweissreichen Exsudat noch bei stufenweiser Verdünnung bis auf 2.0% Eiweiss sicher positiv ausfällt, während sie bei weniger als 1.0% Eiweiss immer negative Resultate zeigt. Es ist dabei gleichgültig, ob das Exsudat mit physiologischer Kochsalzlösung oder mit destilliertem Wasser verdünnt wurde.

Beim Transsudat fällt erst nach Eindampfen die Rivalta'sche Probe positiv aus, wenn der Eiweissgehalt mindestens 1.5% übersteigt; doch selbst dann kommt es vor, dass sie in vereinzelt Fällen negativ ausfällt; bei über 2.0% jedoch ergeben sich stets positive Werte.

Aus den obigen Experimenten ist ersichtlich, dass die Rivalta'sche Probe in der Hauptsache vom Eiweissgehalt abhängig ist, und dass das Eiweiss im Exsudat gegen das im Transsudat keine wesentlichen Unterschiede zeigt.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Aminosäure-Komponenten des Eiweisses im Transsudat, im Exsudat sowie in den anderen Ödemflüssigkeiten sind fast identisch.

TABELLE I.
Eiweisspulver aus dem Exsudat, dem Transsudat sowie dem Serum.

Art d. Ver- suchslösung	Versuchs- number	Alter u. Geschlecht	Krh. Arten	Gesamt-N %	Eiweiss %	α -Amino-N %	% im echten Eiweiss			
							Amino-N Ges.-N	Tyrosin %	Histidin %	Tryptophan %
Transsudat (Ascites)	I	27,	Leberkrebs	10.65	66.5	7.04	66	5.58	1.31	1.29
	II	54,	Leberkrebs	11.97	74.8	8.54	71	5.15	1.22	0.98
	III	78,	Schrumpfluere	13.35	83.4	10.21	77	5.48	1.00	1.31
	IV	52,	Leberzirrhose	12.02	75.3	9.62	80	4.88	1.22	1.09
	V	53,	Leberzirrhose	12.40	77.5	10.26	83	4.80	1.07	1.07
	VI	50,	Lebersyphilis	11.92	74.5	8.82	74	4.60	1.15	0.99
	VII	30,	Peritonitis	12.21	76.3	9.26	76	5.12	1.16	1.02
	VIII	64,	Nephritis-Oedem	11.49	71.8	9.46	82	5.86	0.96	0.85
Durchschnitt							76	5.18	1.13	1.08
Exsudat (Ascites)	IX	22, ♀	Herzklap- penfehler	12.19	76.2	10.14	83	4.54	0.39	1.48
	X	36, ♀	Peritonitis	11.91	74.4	9.43	79	4.64	0.68	1.61
	XI	56, ♀	Peritonitis	12.06	75.4	9.75	81	5.84	0.93	1.17
	XII	52, ♀	Peritonitis	12.47	77.9	9.68	78	4.85	1.03	0.95
	XIII	67, ♀	Peritonitis	11.77	73.6	9.82	83	4.96	1.04	1.20
	XIV	50, ♀	Pleuritis	11.21	70.1	9.05	81	5.29	1.37	1.77
Exsudat (Pleuralthü- sigkeit)	XV	21, ♀	Pleuritis	11.98	74.9	9.70	81	5.06	1.40	1.35
Durchschnitt							81	5.03	1.12	1.42
Kontrolle	Serumeiweiss	Gesund	chr. Nephritis Nephrose Schrumpfluere				80	5.25	1.04	1.03
							80	5.36	1.07	1.16
							75	4.63	1.24	1.16
							80	4.76	1.15	1.32

TABELLE

Transsudat

Krankheitsarten	Versuchsnummer	Alter u. Geschlecht	Character der Körper das Eiweiss		
			Art der Körperflüs- sigkeiten	Makrosko- pische Befunde	Mikrosko- pische Befunde
Leber- zirrhose	I	52 ♂	Ascites	gelbl. klar	Leukozyten wenig
	II	53 ♂	„	„	„
	III	47 ♂	„	gelbl. getrübt	Leukozyt. (+ +) Erythrozyt. (+ +)
	IV	67 ♀	„	gelbl. klar	Leukozyten wenig
Leber- Krebs	V	27 ♂	„	„	„
	VI	54 ♂	„	gelbl. getrübt	„
Leber- syphilis	VII	50 ♂	„	„	„
Herzklap- penfehler	VIII	78 ♂	„	gelbl. klar	Leukozyten frei
	IX	22 ♀	„	„	Leukozyten massenhaft
	X	16 ♀	Pleural- flüssigkeit	gelbl. getrübt	Leukozyten wenig
Nephrose	XI	19 ♀	Ascites	milchig weissl. getrübt	
	XII	24 ♂	„	„	Leukozyten wenig
	XIII	24 ♂	Ödem- flüssigkeit	farblos klar	—
Schrumpf- niere	XIV	64 ♂	„	„	—

II.

-Eiweiss

flüssigkeiten, aus denen
gewonnen wurde

Bemerkung

Isoelektrischer Punkt der
1%igen Eiweisslösungen
(Eiweisspulver aus dem
Transsudat, welches
nach unserem Verfahren
wieder in Lösung
gebracht wurde.)

Spez. Gew.	Rivaltasche Reakt.	Eiweiss %	Albumin Globulin	Blutplasma ($\frac{\text{Alb.}}{\text{Glob.}}$)	Eiweiss im Harn (%)	Phosphat- puffer	Acetat- puffer	Citrat- puffer
1011	—	1.0	49:51	53:47	0.3	4.3	4.4	4.4
1006	—	1.5		43:57	—	4.3	4.4	4.4
1012	—	0.5	44:56		0.06	4.3	4.4-4.2	4.4
1008	—	1.3	50:50		—	4.3	4.4	4.4
1009	—	1.3	52:48	48:52	—	4.3	4.4	4.4
1010	±	1.5	42:58	55:45	—	4.3	4.4	4.4
1010	—	0.6	52:48	59:41	—	4.3	4.4	4.4
1017	—	1.5	53:47	48:52	0.1	4.3	4.4	4.4
1015	+	5.2		51:49	—	4.3	4.4	4.4-4.2
1012	±	2.3	57:43		0.1	4.3	4.4	4.4
1004	—	0.2	46:54	53:47	0.2	4.3	4.4	4.4-4.2
1008	—	0.6	54:46	43:57	20.0	4.3	4.6-4.4	4.4
1004	—	0.5			—	4.3	4.6-4.4	4.4
1006	—	0.6	52:48	54:46	10.0	4.3	4.6-4.4	4.4

Krankheitsarten	Versuchsnummer	Alter u. Geschlecht	Character der Körper das Eiweiss		
			Arten der Körperflüssig- keiten	Makroskopische Befunde	Mikroskopische Befunde
tub. Peri- tonitis	XV	56 ♀	Ascites	gelbl. getrübt	Leukozyten massenhaft, Lymphozyten reichl.
	XVI	36 ♀	„	gelbl. klar	Leukozyten massenhaft, Erythrozyten wenig
	XVII	23 ♂	„	„	Leukozyten wenig
Peritonitis Carci- nomatosa	XVIII	55 ♂	„	gelbl. getrübt	Leukozyten massenhaft, Erythrozyten wenig
	XIX	54 ♂	„	bräunl. klar	Leukozyten massenhaft,
	XX	52 ♂	„	gelbl. bräunl. getrübt	Leukozyten massenhaft, Epithelzellen reichl.
	XXI	42 ♀	„	gelb.	Leukozyten massenhaft, Lymphozyten massenhaft
tub. Pleu- ritis	XXII	50 ♀	Pleural- flüssigkeit	grünl. gelbl. schleimig	Leukozyten massenhaft, Lymphozyten reichl.
	XXIII	21 ♂	„	gelbl. getrübt	Erythrozyten massenhaft, Leukozyten massenhaft
	XXIV	26 ♂	„	grünl. bräunl. getrübt	Erythrozyten massenhaft, Lymphozyten massenhaft
	XXV	26 ♀	„	gelbl. klar	Leukozyten massenhaft, Erythrozyten wenig

TABELLE II.

-Eiweiss						Isoelektrischer Punkt der 1%igen Eiweisslösungen (Eiweisspulver aus dem Exsudat, welches nach unserem Verfahren wieder in Lösung gebracht wurde)		
flüssigkeiten, aus denen gewonnen wurde					Bemerkung			
Spez. Gew.	Rivaltasche Reakt.	Eiweiss %	Albumin Globulin	Blutplasma $\left(\frac{\text{Alb.}}{\text{Glob.}}\right)$	Eiweiss im Harn (%)	Phosphat-puffer	Acetat-puffer	Citrat-puffer
1024	+	6.0	50:50	54:46	—	4.3	4.4	4.4
1015	+	4.8			—	4.3	4.4	4.4
1008	—	0.8	39:61	56:44	0.5	4.3	4.4-4.2	4.4
1020	+	7.0		55:45	—	4.3	4.4-4.2	4.4
1018	+	2.5	62:38	53:47	—	4.3	4.4	4.4
1012	+	4.5			—	4.3	4.4	4.4
1018	+	2.2	47:53	61:39	—	4.3	4.4	4.4
1022	+	7.0	49:51		—	4.3	4.4	4.4
1010	+	6.0	42:58		—	4.3	4.4	4.4
1016	+	4.0	58:42		—	4.3	4.4-4.2	4.4
1022	+	6.5	42:58		0.3	4.3	4.4	4.4

TABELLE III.

Art der Flüssigkeit	Krh.-Arten	Alter u. Geschl.	Spez. Gew.	Eiweiß Gehalt %	Vorbereitungsverfahren zur Prüfung der Rivalta'schen Probe	Rivalta'sche Reaktion					
						nativ	2,0	1,5	1,0	0,5	0,25
Exudat (Ascites)	Peritonitis carcinomatosa	42 ♀	1018	3,6	mit Aqua destillata	+	+	+	±	—	—
					mit physiol. Kochsalzlös.	+	+	+	±	—	—
	Peritonitis carcinomatosa	52 ♂	1012	4,5	mit Aqua destillata	+	+	+	+	±	—
					mit physiol. Kochsalzlös.	+	+	+	±	±	—
Transsudat (Ascites)	Peritonitis tuberculosa	56 ♀	1024	6,0	mit Aqua destillata	+	+	+	±	—	—
					mit physiol. Kochsalzlös.	+	+	+	±	±	—
	Leberzirrhose	47 ♂	1012	0,46	konzentriert	—	+	+	±	—	—
					konzentriert	±	+	±	—	—	—
Gewebssaft	Nephrose	24 ♂	1010	0,6	konzentriert	—	+	±	±	—	—
					(Oedemflüssigkeit) 1004	—	+	+	±	—	—
						—	+	+	±	—	—

2. Der Albumin/Globulin-Quotient der oben genannten drei Eiweissarten ist nahezu der gleiche (50:50).

3. Der isoelektrische Punkt des Eiweisses in den drei geprüften Fällen liegt gleichmässig auf $P_H=4.4$ (bei bestimmten Salzkonzentrationen).

4. Die Rivalta'sche Reaktion hängt hauptsächlich vom Eiweissgehalt der Körperflüssigkeiten ab. Sie fällt bei mehr als 2.0% Eiweiss immer positiv aus, bei weniger als 1.0% stets negativ, doch kann die Salzkonzentration der Flüssigkeiten grossen Einfluss auf sie ausüben.

LITERATUR.

- Adachi (1932): Kongressblatt d. jap. Ges. f. inn. Med., **19**, 1237.
Bernheim (1893): Virchows Arch., **131**, 274.
Furukawa u. Noda (1925): Nissinigaku (japanisch), **14**, 951.
Hiruma (1923): Biochem. Zeitschr., **142**, 506.
Hoffmann (1889): Deutsch. Arch. f. kl. Med., **44**, 313.
Reuss (1879): Biochem. Z., **24**, 583.
Runeberg (1881): Ebendasselbst, **34**, 1.

ÜBER DAS SCHICKSAL DER DEHYDROCHOLSÄURE IM KRÖTENORGANISMUS.

VON

SHIGETOSHI SHIBUYA.

(Aus dem Biochemischen Institut zu Okayama, Japan.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 25. Februar 1933)

In der vorigen Mitteilung (1933) wurde schon erwähnt, dass beim Hundeorganismus etwa 2% der verfütterten Dehydrocholsäure in dessen Fistelgalle unverändert wieder ausgeschieden werden.

Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Dehydrocholsäure zum Teil im Tierorganismus unverändert bleiben kann.

Nach den Untersuchungen vieler Autoren, wie Karasawa (1926), Rosenthal (1927), Tashiro (1925) und Grassmann (1931) soll die gekuppelte Gallensäure im Tierorganismus nicht nur in Aminosäure und Gallensäure zerlegt, sondern auch die Gallensäure selbst so erheblich verändert werden, dass sie ihre wichtige Pettenkofersche Reaktion verlieren kann. Dieser Beweis für den Abbau der Gallensäure im Tierorganismus beruht entweder auf ihrer Farbenreaktion und Oberflächenaktivität, oder auf der gasometrischen Reaktion der gekuppelten Gallensäure.

Nach Wieland und Alles (1922) soll ein Gallensäurederivat in dem Bestandteile des Hautdrüsensekretes der Kröten vorkommen, welcher durch Hydrierung in Desoxycholsäure umgewandelt wird, während die Wintergalle der Kröten hauptsächlich eine mit Desoxycholsäure isomere Bufodesoxycholsäure nach Okamura (1928) enthält. Demnach kann man wohl annehmen, dass die Gallensäure im Krötenorganismus verändert werden kann. In diesem Sinne hat Higashi (1930) Kröten eine gewisse Menge von Cholsäure subcutan verabreicht, den Harn untersucht und gefunden, dass sie zum Teil unverändert im Harn ausgeschieden wird. Daher habe ich das Schicksal der Dehydrocholsäure im

Krötenorganismus im Sommer untersucht, wobei sie als Natriumsalzlösung subcutan verabreicht wurde.

Aus dem Harn wurde ein perlmutterglänzender Nadelkristall erhalten, der in Alkohol, Azeton und Eisessig leicht-, aber in Wasser, Äther und Petroläther nicht löslich ist. Er zeigte keine Pettenkofersche und Myliussehe Reaktion und schmilzt bei 258°C . Seine spezifische Drehung betrug $+28.7^{\circ}$. Nach seiner Analyse und Dioximbildung mit Hydroxylamin ist der Kristall höchstwahrscheinlich eine Diketoxycholsäure.

Nach Borsche wird die Dehydrocholsäure durch katalytische Hydrierung in eine Redukto-(3)-dehydrocholsäure umgewandelt. Ihre Kristallform ist auch eine Nadel, aber ihr Schmelzpunkt liegt viel niedriger ($186\text{--}187^{\circ}\text{C}$) als derjenige der aus dem Krötenharn isolierten Diketosäure. Wenn diese Annahme zutrifft, so muss die neue Diketosäure durch die Reduktion der 7ten oder 13ten Keto-Gruppe im Dehydrocholsäuremolekül entstanden sein, indem die obengenannte Ketogruppe in die Oxygruppe umgewandelt wird. Oder es ist auch möglich, dass die im Krötenorganismus gebildete Redukto-(3)-dehydrocholsäure von Borsche aufs neue in ihre Stereoisomere verwandelt im Harn ausgeschieden wird. Die neue Reduktodehydrocholsäure möchte ich Isoreduktodehydrocholsäure nennen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Die verabreichte Dehydrocholsäure schmilzt bei 237°C und hat $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +30.1$.

Zum Versuche wurden 51 gut ausgewachsene, kräftige Sommerkröten (*Bufo vulgaris japonica*) verwendet, die während des Versuches (15 Tage) keine Nahrung aufnahmen, jedoch wurden ihre Körper von Zeit zu Zeit mit Wasser befeuchtet.

Im Sommer wurden den Kröten je 3–5 ccm einer 1%igen Natriumdehydrocholat- und Glykokollösung einen Tag um den andern subcutan verabreicht, und der in 24 Stunden sezernierte Harn durch Katheterisieren gesammelt. Die verabreichte Dehydrocholsäuremenge betrug insgesamt 14 g, die Glykokollmenge 3 g und der gesammelte Harn 2320 ccm. Der esammelte Harn war

auf Lakmus fast neutral; sein spezifisches Gewicht betrug durchschnittlich 1,015.

Isoreduktodehydrocholsäure.

2.32 Liter Krötenharn wurden auf dem Wasserbade bis zum Trocknen abgedampft, der Rückstand mit Alkohol extrahiert und filtriert. Das Filtrat wurde von Alkohol befreit und unter Zusatz von geringen Mengen Natriumcarbonat in Wasser gelöst. Dann wurde die Lösung mit verdünnter Salzsäure angesäuert; die dadurch ausgeschiedenen gelbbraunen, flockigen Massen wurden abfiltriert und mit kaltem Wasser gut gewaschen. Die Ausbeute betrug ca. 5.9 g. Der Niederschlag wurde wieder in verdünnter Sodalösung gelöst, mit einer 5%igen Eisenchloridlösung versetzt und von der Fällung abfiltriert. Diese Eisenfällung wurde mit Soda zersetzt und filtriert. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade bis zum Trocknen abgedampft, der Rückstand erst in fein pulverisierter Form mit Äther 24 Stunden lang im Soxhletapparat einer erschöpfenden Extraktion unterworfen und dann mit absolutem Alkohol extrahiert. Der alkoholische Extrakt wurde unter Zusatz von ein wenig Wasser mit Tierkohle entfärbt. Das von Alkohol befreite Filtrat wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert.

Die dabei ausgeschiedene, weisse, flockige Masse wurde abfiltriert, mit Wasser gut gewaschen, im Vakuumexsiccator getrocknet und aus möglichst wenig Essigäther zweimal umkristallisiert. Dann wurde sie aus verdünntem Azeton mehrmals umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 0.7 g. Aus verdünntem Azeton kristallisiert sich diese Masse in schönen perlmutterglänzenden Nadeln, die in Eisessig, Alkohol und Azeton leicht, in Äther schwer löslich und in Wasser unlöslich sind. Nach dem Trocknen im Vakuum bei 110°C schmilzt der Kristall bei 258°C. Der Mischschmelzpunkt mit der Dehydrocholsäure (237°C) zeigt eine deutliche Depression. Der Kristall gab keine Pettenkofersche, Myliussche, Hammarstensche, Liebermannsche und Eisenchloridreaktion. Er nimmt kein Brom an und entfärbt eine Permanganatlösung nicht. Er ist nicht stickstoff- und nicht schwefelhaltig und schmeckt bitter.

Zur Verseifung wurde 0.1 g Säure mit 10 ccm einer 5%igen

Natronlauge 6 Stunden lang unter Rückfluss gekocht. Die mit verdünnter Salzsäure ausgefällte Masse wurde aus Azeton umkristallisiert. Sie schmilzt bei 258°C. Der Mischschmelzpunkt mit der ursprünglichen Säure zeigt keine Depression. Die Säure wurde also durch die Hydrolyse mit Natronlauge gar nicht verändert.

Titration: 0.101 g Substanz brauchten 2.55 ccm *N*/10 NaOH

Äquivalent für $C_{24}H_{36}O_5$ Ber. 404

Gef. 396

Die spezifische Drehung zeigt in 1.098%iger Lösung in Azeton, $\alpha = +0.63$, 2 dm.

$$[\alpha]_D^{20} = +28.7$$

Analyse:

4.978 mg Substanz gaben 13.055 mg CO_2 und 3.960 mg H_2O

4.991 „ „ „ 13.050 „ „ „ 4.000 „ „

für $C_{24}H_{36}O_2$ Ber. C 71.04% H 8.91%

C 71.42 „ H 8.98 „

Isoreduktodehydrocholsäuremethylester.

0.13 g der Säure wurden in ein wenig Methylalkohol gelöst und mit einer ätherischen Diazomethanolösung versetzt. Aus der verdünnten Methanolösung schied sich der Methylester in schönen, langen Nadeln ab, die nach dem Trocknen in Zimmertemperatur bei 105°C sintern und bei 126°C schmelzen. 2 Stunden im Trockenschrank bei 110°C getrocknet verlieren sie Kristallwasser und verwandeln sich zu einer weisslichen Masse, die bei 136°C schmilzt. Diese löst sich spielend leicht in Chloroform, Äther und Methanol.

Bestimmung des Kristallwassers.

59.3 mg Substanz beim Trocknen bei 110°C verloren 2.4 mg Gewicht.

für $C_{25}H_{38}O_5 \cdot H_2O$ Ber. 4.12% H_2O

Gef. 4.04 „ H_2O

Die spezifische Drehung zeigt in 0.545%iger Lösung der kristallwasserhaltigen Substanz in Methanol, $\alpha = +0.31$, 2 dm.

$$[\alpha]_D^{20} = +28.44$$

Analyse:

4.800 mg Sub. gaben 12.250 mg CO₂ und 3.980 mg H₂O
 für C₂₅H₃₈O₅.H₂O Ber. C 68.76% ; H 9.26%
 Gef. C 69.33 „ ; H 9.23 „

Iso-reduktodehydrocholsäuremethylesterdioxim.

0.18 g Ester, suspendiert in 50 ccm Methanol, wurde mit 0.11 g Hydroxylamin-chlorhydrat in 0.25 ccm, und mit 0.25 g kristallinischem Natriumacetat in 0.5 ccm Wasser versetzt und einen halben Tag auf dem Wasserbade erwärmt. Dabei resultiert zunächst eine klare Lösung, die nach einiger Zeit anfängt, das Oxim in flimmernden Blättchen abzuscheiden. Die rohe Ausbeute betrug 0.17 g. Nach wiederholter Umkristallisation aus siedendem Methanol unter Zersetzung schmilzt das Oxim bei 248°C. Die spezifische Drehung zeigt in 0.305%iger Lösung in Methanol, $\alpha = +0.15$, 2 dm.

$$[\alpha]_D^{20} = +24.59$$

Analyse:

4.620 mg Sub. gaben 11.300 mg CO₂ und 3.650 mg H₂O
 4.802 „ „ „ 11.780 „ „ „ 3.810 „ „ „
 für C₂₅H₄₀O₅N₂ Ber. C 66.91% ; H 8.99%
 Gef. C 66.73 „ ; H 8.84 „
 C 66.94 „ ; H 8.88 „

3.325 mg Substanz gaben 0.179 ccm feuchten Stickstoff bei 23°C und 764 mm.

3.220 mg Substanz gaben 0.173 mg feuchten Stickstoff bei 22°C und 769 mm.

für C₂₅H₄₀O₅N₂ Ber. 6.25% N.
 Gef. 6.24 „ „
 6.29 „ „

LITERATUR.

- Borsche, W. (1919): Ber. d. deut. Chem. Gesellschaft **52**, 1353.
 Borsche, W. und F. Hallwass (1922): Ber. d. deut. Chem. Gesellschaft, **55**, 3318.
 Grassmann, W. und Basu, K. P. (1931): Z. f. physiol. Chem., **198**, 247.
 Higashi, S. (1930): Arb. a. Med. Univ. Okayama, **2**, 100.

- Karasawa, R. (1926): *Jl. of Biochem.*, **6**, 139.
Okamura, T. (1928): *Jl. of Biochem.*, **8**, 351..
Rosenthal, F., Wislicki, L. und Pommernelle, H. (1927): *Arch. f. exp. Path. und Pharm.*, **122**, 159.
Shibuya, S. (1933): *Jl. of Biochem.*, **17**, 363.
Tashiro, S. (1925): *Jl. of biolog. Chem.*, **63**, 64.
Wieland, H. und Alles, R. (1922): *Ber. d. deut. Chem. Gesellschaft*, **55**, 1789.

BEITRAGE ZUR KENNTNIS DER GALLENSÄURE AUS DER FISTELGALLE DES KANINCHENS.

VON

SHIGETOSHI SHIBUYA U. TOSHIYUKI TANAKA.

(Aus dem Biochemischen Institut zu Okayama, Japan.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 25. Februar 1933)

Es ist im allgemeinen bekannt, dass die Lebergalle viel dünner ist als die Blasengalle, und dass in ersterer viel weniger Gallensäure enthalten ist als in der letzteren. Die Isolierung der Gallensäure aus der Fistelgalle nimmt also eine grössere Menge von Galle in Anspruch.

Was die Gallensäure des Kaninchens betrifft, so haben viele Autoren, wie S. Okamura und T. Okamura, Sekitoo, S. Okamura, Fujiwara u. Fukase dieselbe untersucht und gefunden, dass die Gallensäure der Kaninchengalle hauptsächlich aus Glykocholeinsäure besteht. Nach S. Okamura und T. Okamura, soll aber die Fistelgalle des Kaninchens nur aus Cholsäure bestehen. Jedoch muss auch Glykocholeinsäure in der Fistelgalle vorkommen. In diesem Sinne haben wir unter Zufuhr von Dehydrocholsäure die Fistelgalle untersucht und aus ihr Glykocholeinsäure nach Sekitoo gewonnen.

Dehydrocholsäure ist bekanntlich ein gutes Cholereticum, und aus dem Ergebnis geht hervor, dass bei der Gewinnung der Gallensäure aus Fistelgalle die Zufuhr von Dehydrocholsäure vorzunehmen ist.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Den gallenblasenfisteltragenden Kaninchen wurden täglich 10 ccm einer 5%igen Natriumdehydrocholatlösung per os gegeben; die Fistelgalle wurde gesammelt. Die verabreichte Dehydrocholsäuremenge betrug insgesamt 18 g und die gesammelte Fistelgalle 3 Liter.

Glykcholeinsäure.

3 Liter Fistelgalle wurden auf dem Wasserbade bis auf 500 ccm eingengt und durch Alkohol von Mucin befreit. Das von Alkohol befreite Filtrat wurde mit einer 5%igen Eisenchloridlösung versetzt und von der Fällung abfiltriert. Diese Eisenfällung wurde mit Sodalösung zersetzt und filtriert. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade bis zum Trocknen abgedampft, und der getrocknete Rückstand in feiner pulverisierter Form mit Äther 24 Stunden lang im Soxhletapparat einer erschöpfenden Extraktion unterworfen. Die von Äther befreite Masse wurde mit absolutem Alkohol extrahiert und unter Zusatz von ein wenig Wasser mit Tierkohle entfärbt. Das von Alkohol befreite Filtrat wurde mit Kochsalz ausgesalzen. Diese grauweiße Aussalzung wurde wieder in Wasser gelöst und mit verdünnter Salzsäure angesäuert.

Der abfiltrierte Niederschlag wurde mit kaltem Wasser gut gewaschen. Die Ausbeute betrug ca. 1,4 g. Dieser Niederschlag wurde in Alkohol gelöst und unter Zusatz von ein wenig Wasser mit Tierkohle entfärbt. Das entfärbte und erwärmte Filtrat wurde so lange mit heissem Wasser versetzt, bis eine bleibende schwache Trübung entstand. Nach dem Erkalten schieden sich schöne, weissliche, lange Nadeln ab. Diese Nadelkristalle wurden mehrmals aus Alkohol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug ca. 0,6 g.

Nach dem Trocknen im Vakuum bei 90°C schmilzt der Kristall bei 186°C. Er zeigt die Pettenkofer'sche, aber keine Mylius'sche Reaktion. Er ist stickstoffhaltig und schmeckt bitter.

Titration: 0,095 g Substanz brauchten 2,25 ccm N/10 NaOH.

Äquivalent für $C_{17}H_{34}O_2$ ($C_{26}H_{43}O_5N$)₈ Ber. 429,4

Gef. 422,2

Die spezifische Drehung zeigt in 0,978%iger Lösung in absolutem Alkohol, $\alpha = +0,98$, 2 dm.

$$[\alpha]_D^{20} = +48,56$$

Analyse:

3,019 mg Sub. ergaben 0,076 ccm feuchten Stickstoff bei 23°C u. 769 mm.

3,224 mg Sub. ergaben 0,082 ccm feuchten Stickstoff bei 23°C
u. 769 mm.

für $C_{17}H_{34}O_2(C_{26}H_{43}O_5N)_8$	Ber. 2,92% N.
	Gef. 2,94 „ „
	2,97 „ „

Desoxycholsäure.

Zur Verseifung wurden 0,3 g Glykcholeinsäure mit 20 ccm 5%iger Natronlauge 36 Stunden lang unter Rückfluss gekocht. Die mit Salzsäure angesäuerte Fällung wurde aus heissem Eisessig mehrmals umkristallisiert. Nach dem Trocknen im Vakuum bei 110°C, 18 Stunden lang, schmilzt die Säure bei 172°C.

Titration: 0,0472 g Substanz brauchten 2,45 ccm *N*/20 KOH.

Äquivalent für $C_{24}H_{40}O_4$	Ber. 391
	Gef. 385

Die spezifische Drehung zeigt in 0,385%iger Lösung in absolutem Alkohol, $\alpha = +0.44$, 2 dm.

$[\alpha]_D^{20} = +57,14$

Analyse:

4,481 mg Sub. gaben 12,005 mg CO_2 u. 4,120 mg H_2O .	
4,789 mg „ „ 12,875 mg „ „ 4,320 mg „	
für $C_{24}H_{40}O_4$	Ber. C 73,43% H 10,27%
	Gef. C 73,10 „ H 10,29 „
	C 73,35 „ H 10,10 „

Salzsaurer Glykokolläthylester.

Das von Desoxycholsäure befreite salzsaure Filtrat wurde zum Trocknen gebracht, und aus dem Rückstand in üblicher Weise kristallinisches Glykokollesterchlorhydrat gewonnen, das bei 144°C schmilzt. Die Ausbeute betrug 10 mg.

LITERATUR.

- Fuziwaru, K. u. T. Fukase (1932): JI. of Bioch., **15**, 193.
Okamura, S. u. T. Okamura (1930): Z. Physiol. Chem., **188**, 11.
Okamura, S. (1932): Arb. a. d. Med. Univ. Okayama, **3**, 219.
Sekitoo, T. (1931): Z. Physiol. Chem., **199**, 255.

STUDIES IN EXPERIMENTAL SCURVY.

XVI. The Effect of Irradiated Narcotin on Experimental Scurvy.

By

JITHUICHI SHIMADA.

(From the Laboratory of Biological Chemistry, Tokyo Jikei-Kwai Medical College, Tokyo. Director: Prof. T. Nagayama.)

(Received for publication, March 2, 1933)

I. INTRODUCTION.

On January 1932, A. Rygh, O. Rygh and P. Laland reported that there can be seen a certain relation between vitamin C and narcotin, an opium alkaloid: narcotin is a provitamin C and is widely contained in unripe fruits, but it decreases in proportion to the growing ripeness of the fruits, becoming transformed into vitamin C. According to Rygh's experiments performed with various narcotin derivatives, it can be seen that methylnornarcotin (O-diphenol) has the most prominent curative effect upon experimental scurvy. Furthermore, an irradiated narcotin showed also a slight antiscorbutic potency, i.e., it could protect the guinea pigs from scurvy in daily doses of 2 to 0.001 mg. Although all the animals were completely free from scurvy, they died as did the control ones, within 3 to 4 weeks. I have also investigated the effect of the irradiated narcotin upon experimental scurvy. Towards the end of my experiment, there were published a number of papers against Rygh's work, such as Smith and Zilva (1932), Tillmans and Hirsch (1932), Dalmer and Moll (1932), and Brüggemann (1932). These authors stated that no relation could be found between narcotin and vitamin C; i.e., the irradiated narcotin, as well as the methylnormarcotin, has no antiscorbutic potency.

II. THE METHOD FOR THE PREPARATION OF THE IRRADIATED NARCOTIN.

We have prepared the irradiated narcotin following Rygh's

description (1932). A quartztube provided with a stopp-cock and capable of holding 20 ccm, containing 0.8 gm. of narcotin (merk) and 18 ccm of redistilled acetic ether is evacuated to 2 mm., cooling the tube by means of a freezing mixture. It is then irradiated by a quartzlamp (7.5 Amp.) for $3\frac{1}{2}$ hours, at a distance of 25 cm. rotating the tube all the time. The tube gets warm to 43°C by the irradiating and the narcotin is dissolved in acetic ether to yellow solution after about an hour. The acetic ether is evaporated in a desiccator, evacuating by means of an aspirator and the residue is dried over sulphuric acid, and then recrystallised from alcohol. They are generally needle-shaped crystals, yellow in color, and melted at 173°C . The melting point of the irradiated crystals prepared by Rygh is reported to be 172°C . Therefore, our crystals have to be identical with those of Rygh's ones. These preparations are partly kept in an evacuated brown desiccator and partly in a brown vessel filled with nitrogen gas.

Dalmer and Moll (1932) employed a different way from Rygh's original one for the preparation of the irradiated narcotin. They dissolved the narcotin in alcohol instead of in acetic ether, and irradiated it under complete cooling. However, O. Rygh and A. Rygh (1932) have suggested that it must be irradiated in a warm condition; otherwise it will be quite inactive.

III. THE METHOD FOR FEEDING EXPERIMENT.

For the present experiment, guinea pigs, weighing about 500 gms., were employed and Sherman's ration was used as a vitamin C free basal diet. Each definite amount of irradiated and non-irradiated narcotin was weighed just before using it, and dissolved in 1% tartaric acid so that a daily dose per guinea pig was contained in each 0.5 ccm. of the acid. The animals were fed on Sherman's vitamin C free basal diet and fresh radish juice for one week, and then the fresh radish juice in the ration was replaced by boiled juice for the scorbutic experiment. They were divided into three groups: To the first group, various amounts of irradiated narcotin were given orally or subcutaneously while to the second and the third groups, the non-irradiated narcotin

and the tartaric acid were administered respectively.

IV. RESULTS OF THE EXPERIMENT.

A. Experiment with irradiated narcotin that is kept in a vacuum desiccator.

As the C-vitamin is easily destroyed by air oxygen, especially in the presence of sunlight, so I have kept the prepare in an evacuated brown desiccator. The prepare is weighed each time for the experiment and is dissolved in 1% tartaric acid. The effect of the prepare is tested on the guinea pigs fed on a vitamin C free diet and the following results are reached.

As seen in Table I, in spite of giving the irradiated narcotin subcutaneously (5 mgs., 1 mg., and 0.1 mg. per day) or orally (2 mgs. and 0.2 mg.), the guinea pigs suffered from scurvy as in the cases of the control and all the animals died within 2 to 3 weeks.

B. Experiment with irradiated narcotin that is kept in nitrogen gas atmosphere.

The desiccator which was used for the above experiment, might not be evacuated perfectly and it might be contaminated with some oxygen. For the present work, therefore, I kept the prepare in a brown glass tube (3 cm. \times 18 cm.), holding the rubber stoppers provided with stop-cocks at both ends and completely replacing the air in the vessel by a pure nitrogen gas. The effect of the prepare upon the experimental scurvy was investigated with 10 guinea pigs. Results as shown in Table II were obtained.

As is shown in Table II, the irradiated narcotin kept in the manner mentioned above has also no antiscorbutic potency, and all the animals died from scurvy within 2 to 3 weeks.

V. SUMMARY.

From the above experiments, the following conclusions are reached.

1. When narcotin is dissolved in acetic ether and is irradiated with a quartzlamp for $3\frac{1}{2}$ hours at a distance of 25 cm., some needle-

TABLE I.

Animal No.	Body Weight	Duration of Experiment	Autopsy Findings					Remarks
			Intestine	Suprenals	Teeth	Joints	Ribs	
1	gm. 395	13 days	Hemorrhage	Enlargement	Looseness	Hyperemia	normal	{ 5 mgs. of the irradiated narcotin per day were injected subcutaneously.
2	450	17 "	"	"	"	normal	"	
3	390	19 "	"	"	"	Hemorrhage	"	{ 1 mg. of irradiated narcotin per day was injected subcutaneously.
4	350	13 "	"	normal	"	normal	"	
5	430	16 "	"	Enlargement	"	"	"	{ 0.1 mg. of irradiated narcotin per day was injected subcutaneously.
6	425	14 "	"	normal	"	Hyperemia	"	
7	430	15 "	"	Enlargement	"	"	Hyperemia	{ 2 mgs. of irradiated narcotin per day were given orally.
8	490	16 "	"	"	"	Hemorrhage	Enlargement	
9	450	20 "	"	"	"	"	normal	{ 0.2 mgs. of irradiated narcotin per day were given orally.
10	390	18 "	"	"	"	normal	"	
11	450	12 "	"	"	"	Hemorrhage	Enlargement	{ 1 mg. of non-irradiated narcotin per day was injected subcutaneously.
12	400	13 "	"	"	"	Hyperemia	normal	
13	360	14 "	"	"	"	normal	Enlargement	{ 0.5 ccm of 1 % tartaric acid per day were injected subcutaneously.
14	400	20 "	"	"	"	Hemorrhage	normal	

TABLE II.

Animal No.	Body Weight	Duration of Experiment	Autopsy Findings					Remarks
			Intestine	Suprarenals	Teeth	Joints	Ribs	
1	gm. 420	21 days	Hemorrhage	normal	Looseness	Hemorrhage	normal	5 mgs. of irradiated narcotin per day were injected subcutaneously.
2	520	18 "	"	Enlargement	"	normal	"	
3	450	19 "	"	Hemorrhage	"	Hemorrhage	Enlargement	
4	585	18 "	"	"	"	"	normal	1 mg. of irradiated narcotin per day was injected subcutaneously.
5	470	18 "	"	Hyperemia	"	normal	"	
6	400	18 "	"	Hemorrhage	"	Hemorrhage	Enlargement	
7	585	15 "	"	normal	"	normal	normal	0.1 mg. of irradiated narcotin per day was injected subcutaneously.
8	390	16 "	"	Hemorrhage	"	"	"	
9	405	21 "	"	"	"	Hemorrhage	Enlargement	
10	555	16 "	"	Enlargement	"	normal	normal	2 mgs. of irradiated narcotin per day were orally given.
								0.2 mgs. of irradiated narcotin per day were orally given.

shaped crystals, yellow in color, and melted at 173°C, are obtained.

2. The irradiated narcotin kept in a brown desiccator evacuated as much as possible and kept in a brown glass tube filled with nitrogen gas has no antiscorbutic effect upon the experimental scurvy.

REFERENCES.

- Brüggemann, J. (1932): Zeitschr. f. Physiol. Chem., **211**, 22.
Dalmer and Moll (1932): Zeitschr. f. Physiol. Chem., **209**, 211.
Laland, P. (1932): Zeitschr. f. Physiol. Chem., **204**, 112.
Rygh, O., Rygh, A. and Laland, P. (1932): Zeitschr. f. Physiol. Chem., **204**, 108.
Rygh, O., and Rygh, A. (1932): Zeitschr. f. Physiol. Chem., **204**, 117.
Sherman and Smith (1922): The vitamins.
Smith and Zilva (1932): Chem. a. Industry, **51**, 8, 166.
Tillmans and Hirsch (1932): Biochem. Z., **250**, 312.

Additional writing:

We are indebted to Count Mutsu and Baron Takagi for the expense of the work, which have been defrayed from Ujun-Kwai.

BEITRÄGE ZUR EMBRYOCHEMIE DER AMPHIBIEN.

VON

MASAJI TOMITA U. HIDEKATSU FUJIWARA.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen
Fakultät in Nagasaki.)*

(Eingegangen am 7. März 1933)

Versuche an einzelnen Zellen von gleichartiger Struktur bieten viele Vorteile gegenüber solchen an zusammengesetzten Organismen. Äussere Beeinflussungen und mancherlei Lebensvorgänge lassen sich besser feststellen, als wenn Gewebe vorliegen; die Ergebnisse treten im einzelnen Fall meistens klarer zutage. Unter allen Organen und Organismen müssen also sich entwickelnde Eier zuerst in Frage kommen, wenn es gilt, das Leben der Zelle vom Standpunkt der Biochemie aus möglichst genau zu verfolgen. Da man bei dem Versuch, diese Aufgabe zu lösen, oft auf die früheren Entwicklungsstufen zurückgreifen und diese zur Erklärung heranziehen muss, und da die winzig kleinen Eier des Menschen und der Säugetiere aus leicht ersichtlichen Gründen kaum Gegenstand einer exakten Untersuchung werden können, so dienen als Hauptobjekt der Untersuchung vornehmlich die grobwahrnehmbaren, leicht zugänglichen und ausserhalb der mütterlichen nutritiven Sphäre sich entwickelnden Eier. Naturgemäss spielen sich im Ei während der Entwicklung des Keimlings tiefgreifende chemische und energetische Umsetzungen ab. Die zum Aufbau und zur Bestreitung der Lebensbedürfnisse des keimenden Embryos notwendigen Stoffe sind in Eiern, deren Entwicklung sich ausserhalb des mütterlichen Organismus vollzieht, genugsam vorgebildet und werden im Eiinhalt nach Bedarf umgesetzt und verwertet. Die im Eiinhalt während der Bebrütung nachweisbaren chemischen Prozesse laufen letzten Endes naturgemäss auf eine Überführung der vorhandenen Vorratsstoffe des Eiinhaltes in die in der Bildung begriffenen Gewebe und Organe des Keimlings hinaus. Sie bestehen demnach im wesentlichen in einer Aufspaltung, Über-

führung und Umwandlung der organischen und anorganischen Substanzen der genannten Bestandteile.

Es ist also ein ausserordentlich verlockendes Problem, zu verfolgen, wie die einzelnen Stoffe im werdenden Embryo sich zusammenfügen, und wie schliesslich aus einer Reihe von Verbindungen die Zelle wird. Vor unseren Augen sehen wir fast plötzlich den Blutfarbstoff auftreten und an Menge zunehmen. Wir beobachten das erste Auftreten der Blutkörperchen, und wie die Muskelsubstanz, das Nervengewebe und die Anlage des ganzen Knochensystems sich aus der Eisubstanz formen. Bei jedem einzelnen, neu auftretenden Stoff müssten wir eigentlich verfolgen können, auf Kosten welcher vorgebildeten Substanz des Eiinhaltes er gebildet wird, da von aussen keine Zufuhr erfolgt. Wir können die im Eiinhalt während des Auskeimens verlaufenden chemischen Prozesse grundsätzlich durch successive Analyse des Eiinhaltes auf die in Frage kommenden Substanzen im Laufe der Entwicklung, womöglich unter Sonderung der auf den werdenden Embryo (samt Adnexen) und den verbleibenden Rest der ursprünglichen Einasse entfallenden Anteile erkennen. Da damit vielleicht ein Anhaltspunkt für die Beziehungen zwischen Baumaterial und fertigem Gebäude gefunden wäre, so soll alles versucht werden, um Schritt für Schritt die Zwischenglieder der Umwandlung der einzelnen Stoffe ineinander festzustellen. Wir wollen hoffen, dass es der embryogenetischen Chemie dereinst vergönnt sein wird, die Lösung mancher Daseinsrätsel ausfindig zu machen, obwohl das eben Dinge sind, die ihrer Natur nach nur langsam der Zukunft entgegenreifen können.

Das Problem selbst ist hierbei bisher im wesentlichen nach zwei Richtungen verfolgt worden: einmal hinsichtlich des Bilanzstoffwechsels der keimenden Eier (besonders Wasserhaushalt, Gaswechsel und Energieumsatz), dann auch, besonders in neuerer Zeit, hinsichtlich der im Eiinhalt ablaufenden qualitativen und quantitativen Veränderungen seiner Bestandteile. Wir haben schon seit Jahren ziemlich ausgedehnte chemische Untersuchungen bei der Bebrütung des Vogel-, Reptilien- und Gastropodeneies ausgeführt. Die meisten Amphibieneier sind aber so klein, dass sie

sich der genauen Untersuchung entziehen. Unter ihnen sind nur die Eier des Riesensalamanders grobwahrnehmbar und gehören zu den Ausgangsmaterialien, die dem Biochemiker zu Gebote stehen.

Der Riesensalamander, *Megalobatrachus maximus* Schl. (*Chryptobranchus japonicus*) kommt nur in der südwestlichen Hälfte der Hauptinsel Japans vor, und zwar an verschiedenen Stellen der Wasserscheide. Man findet das Tier stets in kaltem, rasch fliessendem Wasser, 200–600 m, manchmal 1000–1500 m über dem Meere. Hier lebt es in den kleinen, klaren Quellbächen, verbirgt sich an dunkeln Stellen unter Felsen, längs der Ufer oder in der Mitte der Strömung. Die Eier stecken in 3–10 Fuss tiefen, wagerecht verlaufenden Löchern in ruhigem Wasser. In dem Loche, wo man Ende August bis Anfang Oktober ein Weibchen gesehen hat, findet man einen Eierklumpen. Das Weibchen legt seine mit Ausnahme des oberen, weisslichen Pols gelblichen, 6–7 mm messenden Eier in rosenkranzähnlichen Schnüren ab. Die Legezeit des Riesensalamanders beginnt meistens Ende August und währt höchstens bis Mitte Oktober. Die Tiere legen gewöhnlich zwei bis fünfhundert Eier. Die Eier sind länglich und an beiden Seiten in gleicher Weise abgerundet. Jedes Ei schwimmt in einer klaren Perivitellinflüssigkeit, die in eine gallertartige, kugelige Umhüllung von 1,35–1,62 cm Durchmesser eingeschlossen ist; diese Hülle ist mit der des nächsten Eies durch einen dünnen Strang verbunden, der ungefähr so lang ist wie die längere Achse der einzelnen Hülle.

Wegen der grossen Durchsichtigkeit der Kapselwand ist die weitere Entwicklung vom befruchteten Ei bis zum Ausschlüpfen der Larve Schritt für Schritt zu verfolgen. Die Jungen schlüpfen je nach der Temperatur des Wassers nach Verlauf von 1–2 Monaten aus. Bei unseren Untersuchungen verstrichen von der Eiablage an bis zum Ausschlüpfen der Larven fast 30 Tage.

Da es nun äusserst schwer ist, eine zur Untersuchung ausreichende Zahl Riesensalamandereier zu bekommen, so blieb dieses Ei bei dem Studium der Embryochemie, besonders der Bebrütung, bisher ganz unberücksichtigt. Bei einer glücklichen Gelegenheit konnten wir im vorigen Sommer über zweitausend Eier bekommen

und haben diese bei unsern chemischen Untersuchungen verwendet.

Die Zahl der verwendeten Eier in den verschiedenen Entwicklungsstadien und ihr Gewicht sind in der Tabelle I zusammengestellt worden.

TABELLE I.

Bebrütungs- dauer	Unbefruchtet	1-2 Wochen	2-3 Wochen	3-4 Wochen
Zahl	1235	49	435	414
Gewicht	174,5	159,6	1104,0	1497,5

Die Perivitellinflüssigkeit ist wasserklar. Ihr Gewicht beträgt ungefähr 70-75% des Gesamtgewichts des bebrüteten Eies. Sie ist in eine gallertartige Umhüllung eingeschlossen. Das Gallert ist auch durchsichtig, und durch seine physikalischen Eigenschaften werden die Eier vor Schädigungen geschützt. Die Verhältniszahlen der Gewichte von Embryo (oder Dotter), Gallert und Perivitellinflüssigkeit sind in der Tabelle II zusammengestellt.

TABELLE II.

Auf 100 Eier berechnet.

Bebrütungs- dauer	Embryo oder Dotter		Gallert		Perivitellin- flüssigkeit		Gesamt- gewicht g
	g	%	g	%	g	%	
Unbefruchtet	14,1	100	—	—	—	—	14,1
1-2 Wochen	12,4	3,8	82,4	25,3	230,9	70,9	325,7
2-3 Wochen	9,2	3,6	53,8	21,2	190,8	75,2	253,8
3-4 Wochen	15,1	4,2	73,8	20,4	272,8	75,4	361,7

Auf 100 Embryos (oder Dotter) berechnet, verteilen sich die Nährstoffe wie Tabelle III zeigt.

Das Gewicht des Embryos ist demgemäss hauptsächlich von dem Wassergehalt abhängig. Der Wassergehalt ist dem an Fettsubstanz umgekehrt proportional.

Bei der Ermittlung des Gesamt- und Reststickstoffes stellte sich bemerkenswerterweise heraus, dass die Gesamt- und Reststick-

TABELLE III.

Bebrütungs- dauer	Wasser		Fettfreie Trockensubst.		Fettsbst.		Gesamt- gewicht g
	g	%	g	%	g	%	
Unbefruchtet	6,9	48,7	4,7	33,6	2,5	17,7	14,1
1-2 Wochen	6,8	55,9	3,8	29,6	1,8	14,5	12,4
2-3 Wochen	4,6	50,0	3,1	33,7	1,5	16,3	9,2
3-4 Wochen	10,0	66,2	3,4	22,5	1,7	11,3	15,1

stoffmengen des Riesensalamandereies im Vergleich zu dem Hühnerei oder Meerschilkrötenei auffallend gering sind. Kreatin und Kreatinin sind spurweise vorhanden.

An den Umsetzungen, welche den energetischen Bedürfnissen des Keimlings dienen, sind die Fettstoffe und Glykogen beteiligt. Freie Glukose war kaum nachweisbar.

Wegen des Mangels an Untersuchungsmaterial konnten wir den Harnstoff, die Harnsäure und die Fermente nicht untersuchen. Darüber wollen wir in diesem Sommer weiter arbeiten.

Für die Sammlung der Eier, sowie für Beobachtungen und Mitteilungen über Riesensalamander sagen wir Herrn Isamu Mizushima unseren besten Dank. Auch Herrn Prof. Kunitomo, dem Vorstand des hiesigen anatomischen Institutes, sei ehrerbietig für seine Beihilfe gedankt.

BEITRÄGE ZUR EMBRYOCHEMIE DER AMPHIBIEN.

II. Physikalische Eigenschaften der Perivitellin- flüssigkeit des Riesensalamandereies.

VON

HIDEKATSU FUJIWARA u. SHIGERU TSUNOO.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Fakultät in
Nagasaki. Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 7. März 1933)

Es ist eine seit altersher bekannte Tatsache, dass die meisten marinen Tiere, in Süßwasser übertragen, alsbald zugrunde gehen. Es gibt auch einige Tiergruppen, die absolut nicht befähigt scheinen, sich dem Salzwasser anzupassen. Dies erscheint uns sozusagen selbstverständlich. Denn man weiss längst, wie empfindlich tierische ebenso wie pflanzliche Zellen selbst gegen geringe Änderungen des osmotischen Druckes sind, geschweige denn gegen eine so gewaltige Konzentrationsänderung der umgebenden Flüssigkeit, wie sie dem Übergange von See- zu Süßwasser und umgekehrt entspricht.

Wie schon vorstehend mitgeteilt, ist der Gehalt des Embryos des Riesensalamanders an Wasser und Trockensubstanz in den verschiedenen Entwicklungsperioden nicht immer gleich. Es muss deshalb mit der Möglichkeit gerechnet werden, dass es sich um Unterschiede in der Verwertbarkeit des Wassers handelt. Gewisse physiologische Eigentümlichkeiten, welche einen schnellen osmotischen Ausgleich zwischen den Körpersäften und dem umgebenden Medium zu verhindern scheinen, ermöglichen nun manchen Organismen ein Sicheinstellen auf die besten Bedingungen für die Anpassung an ein umgebendes Medium. Man kann also aus den physikalischen Eigenschaften des umgebenden Mediums die physikalischen Existenzbedingungen der Organismen einigermassen erschliessen.

Aus diesem Grunde haben wir die bis jetzt gar nicht berücksichtigten physikalischen Eigenschaften der Perivitellinflüssigkeit

des Riesensalamandereies untersucht, in der jedes Ei bis zum Auschlüpfen der Larve schwimmt.

Um das Untersuchungsmaterial zu bekommen, wurde die umhüllende Gallerte zunächst mit der Pinzette oder mit Glasstäbchen zerrissen; dann kann mit Hilfe einer Spritze die Perivitellinflüssigkeit völlig und ohne Beimischung von Dotter abgesaugt werden.

Die Perivitellinflüssigkeit ist dünnflüssig, wasserklar und ganz farblos. Gegen Lackmus reagiert sie fast neutral. Nur im Endstadium der Bebrütung reagiert sie schwach sauer. Die Wasserstoffionenkonzentration wurde mittels Prism-Komparators von Michaelis ermittelt. Das spezifische Gewicht wurde stets mittels des Pyknometers bestimmt. Um den osmotischen Druck und die molekulare Konzentration zu berechnen, wurde die Gefrierpunktsniedrigung beobachtet. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse.

TABELLE I.

Bebrütungsdauer	PH	Δ	Spezifisches Gewicht
1-2 Wochen	7,1	0,000	beinahe gleich dem des Wassers
2-3 Wochen	7,1	0,001	„
3-4 Wochen	6,9	0,001	„

Die physikalischen Eigenschaften der Perivitellinflüssigkeit sind also fast gleich denen des Wassers. Es ergibt sich daher, dass für das Riesensalamanderei vom Anfang der Bebrütung an das Wasser ein ganz geeignetes Medium ist, und dass ein Stoffaustausch zwischen dem Embryo und der Perivitellinflüssigkeit nur in ganz geringem Masse sich vollzieht.

BEITRÄGE ZUR EMBRYOCHEMIE DER AMPHIBIEN.

III. Über das Verhalten der anorganischen Bestandteile bei der Bebrütung des Riesensalamandereies.

VON

TOSHINORI ISEKI UND TEKI KUMON.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Fakultät in
Nagasaki. Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)*

(Eingegangen am 7. März 1933)

Die Botaniker haben es frühzeitig gelernt, auf ihrem Gebiete den Weg zu gehen, der die Frage beantworten kann, welche anorganischen Stoffe beim Aufbau des Organismus Verwendung gefunden haben, und welche von denselben auch wirklich unentbehrlich waren, indem sie Pflanzen auf Medien von bekannter chemischer Zusammensetzung kultivierten. Die Ausbildung der Methode der Nährstofflösungen, in denen Keimlinge der verschiedensten Pflanzen zur Entwicklung gebracht wurden, hat es hier ermöglicht, die einschlägigen Fragen mit grosser Präzision zu beantworten.

Viel schwieriger liegen naturgemäss die Verhältnisse für die Tierphysiologen, und so kam es denn, dass genaue systematische Versuche, durch embryochemische Untersuchungen der ausserhalb einer mütterlichen nutritiven Sphäre heranwachsenden Tierklassen diese Frage aufzuklären, erst in neuerer Zeit angestellt wurden.

Es ist ein grosses Verdienst von J. Karashima (1928), durch eine Reihe ebenso gründlicher wie mühevoller Untersuchungen, welche die Entwicklung von Meerschildkröteneiern betreffen, der Erforschung des Salzstoffwechsels einen Weg vorbereitet zu haben.

Seine Untersuchungen haben ergeben, dass sich in dem späteren Stadium der Bebrütung eine beträchtliche Vermehrung des Kalks und des Magnesiums findet, und dass dabei die Schale teilweise abgebaut und zum Aufbau des Embryos verwendet wird. Es ergab sich weiter als wesentlicher Befund, dass die anorganische Phosphorsäure während der Entwicklung in bedeutenden Masse zunimmt, und dass als Phosphorquelle die organischen Phosphor-

verbindungen dienen.

Zwei Jahre später hat der eine von uns (Iseki) in ähnlicher Weise die anorganischen Bestandteile in ganz verschiedenen Entwicklungsstadien des Hühnerembryos systematisch verfolgt und kam zu dem Schluss, dass der Kalk im ganzen Eiinhalt im Spätstadium der Bebrütung beträchtlich zunimmt, während er in der Schale abnimmt, und dass die im Eierklar ursprünglich reichlich vorhandenen Alkalisalze zunächst durch die Dotterhaut in den Dotter diffundieren, dort weiter mobil bleiben und in den Embryo überführt werden.

Zwecks Ergänzung der Untersuchungen über Salzstoffwechsel bei der Eibebrütung sind von uns Riesensalamandereier auf das Verhalten der Salze wie folgt untersucht worden:

Die Dotter oder die Embryos wurden von der Gallerte und Perivitellinflüssigkeit abgetrennt und mit Alkohol und Äther gründlich extrahiert. Der in Alkohol und Äther unlösliche Rückstand wurde in der bekannten Weise auf Phosphat, Kalk und Silikat bearbeitet. Der Hauptteil der organischen Phosphorverbindungen sollte dabei in Alkohol-Ätherische Fraktion übergehen. Andere Mineralbestandteile konnten ihrer zu kleinen Menge wegen nicht analysiert werden. Die quantitative Zusammensetzung der einzelnen Mineralbestandteile lässt sich aus folgender Zusammenstellung übersehen.

Es ergab sich also als bemerkenswerter Befund, dass die Gesamtasche und die anorganische Phosphorsäure in dem letzten Entwicklungsstadium zunimmt. Im Gegenteil zum Hühner- und

TABELLE I.

Bebrütungs- dauer	Gehalt von 100 Embryos (oder Dottern) an						
	Gesamt- gewicht g	Fettfreier Trockensubst. g	Gesamt- asche g	P ₂ O ₅ g		CaO g	SiO ₂ g
				anorg.	org.		
Unbefruchtet	14,1	4,7	0,1020	0,0525	0,0384	0,0047	0,0062
I.-II. Woche	12,4	3,8	0,0957	0,0375	0,0491	0,0178	0,0042
II.-III. Woche	9,2	3,1	0,0798	0,0366	0,0167	0,0143	0,0045
III.-IV. Woche	15,1	3,4	0,1282	0,0547	0,0196	0,0111	0,0056

TABELLE II.

Bebrütungs- dauer	Gesamtgewicht der Gallerte von 100 Eiern g	Gehalt der Gallerte von 100 Eiern an	
		Trockensubst. g	Gesamtasche g
I.-II. Woche	69,2	1,4	0,0942
II.-III. Woche	51,0	1,4	0,0779
III.-IV. Woche	51,4	1,3	0,0872

Reptilienei erreicht der Kalkgehalt schon im früheren Entwicklungsstadium seinen Höhepunkt.

LITERATUR.

Iseki (1930): Zs. f. physiol. Chem., **188**, 189.

Karashima (1928), Jl. of biochem., **10**, 369.

BEITRÄGE ZUR EMBRYOCHEMIE DER AMPHIBIEN.

IV. Über das Verhalten der N-haltigen Verbindungen bei der Bebrütung des Riesensalamandereies.

VON

TOSHINORI ISEKI, TEKI KUMON, ICHIMATSU TAKAHASHI
UND FUJITO YAMASAKI.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Fakultät
in Nagasaki. Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 7. März 1933)

Dass während der Entwicklung von Embryonen eine Neubildung der stickstoffreichen Basen stattfindet, geht aus den Untersuchungen Tichomiroff's (1885) hervor. Er fand, dass die Menge von Guanin, Hypoxanthin u. a. während der Bebrütung der Eier von *Bombyx mori* beträchtlich zunimmt. Levene (1899) hat auch versucht, die Verschiedenheiten im Gehalte an Eiweisskörpern und an anderen stickstoffhaltigen Substanzen in bebrüteten Eiern ungleichen Alters festzustellen; er hat ferner angeführt, dass bebrütete Eier Monoaminosäuren enthalten. Tomita (1921) hat später angegeben, dass die im Eierklar und im Dotter des Hühnereies vorhandenen Reststickstoffformen sich während der Bebrütung mit fortschreitender Entwicklung des Embryos vermehren. Diese Erfahrungen wurden weiter von Nakamura (1928) auf Reptilieneier ausgedehnt. Was das Kreatin und Kreatinin im Hühnerei betrifft, so gelangten Mellanby (1907), Needham (1925) und Sendzu (1927) zu dem Ergebnis, dass das Kreatin sich nach 14 tägiger Bebrütung mit fortschreitender Entwicklung des Embryos vermehrt, während der Kreatiningehalt fast konstant bleibt.

Unsere Untersuchungen hatten den Zweck, die Kenntnis des bisher kaum erforschten Stoffwechsels der N-haltigen Verbindungen durch die Untersuchung der bei der Bebrütung des Riesensalamandereies obwaltenden Verhältnisse zu erweitern.

Um die Mengenverhältnisse der Reststickstoffformen gegenüber

dem Gesamtstickstoff zu finden, haben wir zunächst die Gesamtstickstoffmenge der einzelnen Teile des Eies auf bekannte Weise ermittelt. Dotter, Perivitellinflüssigkeit und Gallerte wurden sorgfältig getrennt.

Die Ermittlung des Reststickstoffes geschah genau so wie bei den Hühner- und Reptilieneiern. Das Kreatin und Kreatinin des Embryos wurden nach der Enteiweissung mit Schenckseher Lösung nach dem Folin und Denisschen Vorschlag kolorimetrisch bestimmt. Der Übersichtlichkeit halber sollen die wesentlichen Untersuchungsergebnisse in einer Gesamttabelle kurz zusammengestellt mitgeteilt werden.

TABELLE I.

Bebrütungs- dauer	Gesamt- gewicht der 100 Embryos (od. Dotter) g	Gehalt von 100 Embryos (od. Dottern) an				
		Fettfreier Trocken- Substanz g	Gesamt-N mg	Rest-N mg	Kreatinin mg	Kreatin als Kreatinin berechnet mg
Unbefruchtet	14,1	4,7	654,71	6,58	0,06	0,06
I.-II. Woche	12,4	3,8	534,66	6,84	0,06	0,09
II.-III. Woche	9,2	3,1	458,80	5,89	0,06	0,10
III.-IV. Woche	15,1	3,4	486,88	10,20	0,07	0,14

TABELLE II.

Bebrütungs- dauer	Gesamtgewicht der Gallerte von 100 Eiern g	Gehalt der Gallerte von 100 Eiern an	
		Trockensubst. g	Gesamt-N mg
I.-II. Woche	69,2	1,4	98,7
II.-III. Woche	51,0	1,4	72,8
III.-IV. Woche	51,4	1,3	77,0

Aus den angeführten Befunden ergibt sich:

1. Die Gesamt- und Reststickstoffmengen des Riesensalamandereies sind im Vergleich zum Hühner- und Reptilienei auffallend gering.

2. Die im Salamanderei vorhandenen Reststickstoffformen vermehren sich im letzten Entwicklungsstadium.
3. Das Kreatin und Kreatinin sind nur spurweise vorhanden.

LITERATUR.

- Levene (1899): Zs. f. physiol. Chem., **35**, 80.
Mellanby (1907): Jl. of Physiol., **36**, 474.
Nakamura (1928): Jl. of Biochem., **10**, 357.
Needham (1925): Physiol. Reviews, **5**, 36.
Sendzu (1926): Jl. of Biochem., **7**, 181.
Tichomiroff (1885): Zs. f. physiol. Chem., **9**, 566.
Tomita (1921): Biochem. Zs., **116**, 12.

BEITRÄGE ZUR EMBRYOCHEMIE DER AMPHIBIEN.

V. Über den Kohlehydratstoffwechsel bei der Bebrütung des Riesensalamandereies.

VON

EISEI KATAOKA u. SHIGERU TSUNOO.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Fakultät
in Nagasaki. Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)*

(Eingegangen 7. März 1933)

Das Glykogen kommt im Organismus der Wirbeltiere ausserordentlich weit verbreitet vor und dürfte als ein Bestandteil aller wachstumsfähigen Zellen aufzufassen sein. Die embryonalen Gewebe sowie alle jene Organe, in denen sich lebhaft Zellproliferationsvorgänge abspielen, enthalten reichliche Glykogenmengen.

Bataillon und Couvreur (1892–1895) zeigten, dass der Gehalt an Glykogen und Zucker während der Metamorphose des Seidenspinners wesentliche Änderungen erfährt. Viele Tatsachen dürften genügen, um zu zeigen, dass der Kohlehydratstoffwechsel niederer Lebewesen weitgehende Analogien mit demjenigen der höchstorganisierten Tiere bietet, und dass hier wie dort Kohlehydratreserven zum Teil in besonderen Organen in Form von Glykogen oder einer diesem nahe verwandten Substanz deponiert werden, um in Bedarfsfällen als Energiequelle zu dienen.

Was nun den Kohlehydratstoffwechsel bei der Eientwicklung betrifft, so wurde die freie Glukose von Bywaters (1913), Sato (1916) und Idzumi (1924) in den Hühnereiern, von Tomita (1921–1928) in Hühner- und Meerschildkröteneiern geprüft. Das Glykogen wurde von Tichomiroff (1885) in den Bombyxeiern nachgewiesen. Er verglich die quantitative Zusammensetzung der Bombyxeier vor und nach der Bebrütung und fand dabei, dass die Eier während ihrer Entwicklung einen Teil des Glykogens verlieren. Ausführliche Untersuchungen wurden von Idzumi (1924), Murray (1928) und Kataoka (1931) bei Hühnereiern ausgeführt.

Wir sind dieser Frage nun beim Riesensalamanderei näher getreten. Als Untersuchungsmaterial benutzten wir einerseits unbefruchtete Eier, die noch im Mutterleibe versteckt waren, und andererseits bebrütete Eier, die 2 bis 3 Wochen bzw. 3 bis 4 Wochen alt waren. Die Eier des früheren Entwicklungsstadiums konnten, da wir zu wenig Material davon hatten, nicht untersucht werden.

Um das Glykogen zu isolieren, wurden zunächst die Dotter oder Embryos mit Alkohol durchgerührt, am nächsten Tage abgesaugt, dann mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen. Die weisse getrocknete Masse wurde darauf mit 60%iger Kalilauge 2 Stunden lang gekocht und weiter nach Angabe von Pflüger auf Glykogen verarbeitet. Die durch Säurehydrolyse abgespaltene Glukose wurde nach Bertrand ermittelt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle I enthalten.

TABELLE I.

Bebrütungs- dauer	Gesamtgewicht von 100 Embryos (od. Dottern) g	Gehalt von 100 Embryos (od. Dotter) an	
		fettfreier Trockensubst. g	Glykogen als Traubenzucker g
unbefruchtet	14,1	4,7	0,1868
II.-III. Woche	9,2	3,1	0,1411
III.-IV. Woche	15,1	3,4	0,1044

Stellt man die Resultate einander gegenüber, so findet sich in dem späteren Stadium eine Verminderung des Glykogens.

Freie Glukose konnte in jedem Entwicklungsstadium nur spurweise nachgewiesen werden.

LITERATUR.

- Bataillon, E. u. Couvreur (1892): *Compt. rend. Soc. Biol.*, **44**, 669.
 Couvreur, E. (1895): *Compt. rend. Soc. Biol.*, **47**, 796.
 Bywaters, H. W. (1913): *Bioch. Z.*, **55**, 245.
 Idzumi, S. (1924): Mitteilung a. d. med. Fakultät Univ. Tokyo, **32**, 197.
 Kataoka, E. (1931): *H-S.*, **203**, 272.
 Murray, H. A. (1926): *Jl. Gesamt. Physiol.*, **9**, 405.
 Sato, G. (1916): *Act. Schol. Med. Univ. Kyoto*, **1**, 375.
 Tomita, M. (1921): *Bioch. Z.*, **116**, 22.
 Tomita, M. (1928): *Jl. of biochem.*, **10**, 355.

BEITRÄGE ZUR EMBRYOCHEMIE DER AMPHIBIEN.

VI. Über das Verhalten der Fettsubstanzen bei der Bebrütung des Riesensalamandereies.

VON

EISEI KATAOKA u. ICHIMATSU TAKAHASHI.

(Aus dem *physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Fakultät in Nagasaki. Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.*)

(Eingegangen am 7. März 1933)

Tangl und Farkas (1903–1908) haben durch ihre kolorimetrischen Untersuchungen den Begriff der Entwicklungsarbeit eingeführt. Es hat sich dabei herausgestellt, dass in den Anfangsstadien der Embryogenese zur Entwicklung der lebenden embryonalen Substanz die Umwandlung einer grösseren Menge chemischer Energie erforderlich ist als zur Entwicklung derselben Substanzmenge in den reiferen Stadien, und dass die zur Entwicklungsarbeit im Hühnerei nötige Energie hauptsächlich aus dem chemischen Energievorrat des Eifettes geschöpft wird. Neben den Umsetzungen des Eifettes, welche den energetischen Bedürfnissen des Keimlings dienen, spielen die auf dessen Baustoffwechsel gerichteten eine beträchtliche Rolle.

Als allgemein verbreitete Eibestandteile können wohl die Cholesterine gelten, deren physiologische Bedeutung unser Interesse auf sich gezogen hat, wenn sie auch noch nicht ganz klar ist.

Über das Verhalten der Fette bei der Bebrütung von Hühner- und Reptilieneiern haben schon Karashima (1928) und Kusui (1932) im hiesigen Institute Untersuchungen angestellt. Von Thannhauser und Schaber (1923), Kusui (1929) und Dam (1930–1931) wurde der Cholesteringehalt von Hühnereiern vor und nach erfolgter Entwicklung des Hühnchens festgestellt. Kusui (1929) hat das Verhalten des freien Cholesterins und des Cholesterinesters auch bei der Bebrütung des Meerschildkröteneies untersucht.

Im Anschluss an diese Beobachtungen bei Hühner- und

Reptilieneiern haben wir den Versuch unternommen, einerseits ein übersichtliches Bild von der Art und relativen Menge der Komponenten des Fettes von bebrüteten Riesensalamandereiern zu verfolgen, und andererseits das Verhalten des Cholesterins in denselben Eiern zu untersuchen.

Als Untersuchungsmaterial verwendeten wir dabei zum Teil unbefruchtete Eier, die im Leibe der Muttertiere versteckt sind, und zum Teil bebrütete Eier, die 1 bis 4 Wochen alt waren.

*A. Menge und Eigenschaften der Fettsubstanzen
der Riesensalamandereier.*

Zur Isolierung der Fettsubstanzen wurden die Embryos (oder Dotter) von Gallerte und Perivitellinflüssigkeit getrennt und dann mit Alkohol und Äther erschöpfend extrahiert. Die Mengen der in verschiedenen Fraktionen extrahierten Fettsubstanzen wurden, auf 100 Eier berechnet, kurz in Tabelle I zusammengestellt.

TABELLE I.

Bebrütungs- dauer	Gehalt von 100 Embryos (oder Dottern) an			
	Gesamtfett- substanz g	Alkohol l. Äther l. Fraktion g	Alkohol l. Äther unl. Fraktion g	Alkohol unl. Äther l. Fraktion g
unbefruchtet	2,50	1,82	Spur	0,67
1-2 Wochen	1,80	1,79	„	—
2-3 Wochen	1,56	1,56	„	—
3-4 Wochen	1,73	1,73	„	—

Der Hauptteil der Fettsubstanzen der bebrüteten Eier wurde in der in Alkohol und Äther löslichen Fraktion gefunden, während bei unbefruchteten Eiern eine nicht geringe Menge der Fettsubstanzen (ca. 1/4) in der in Äther löslichen, aber in Alkohol unlöslichen Fraktion isoliert wurde.

Um gewisse Anhaltspunkte über die Zusammensetzung der Fettsubstanzen von Riesensalamandereiern in den verschiedenen Entwicklungsperioden zu erhalten, wurden die sogenannten Kennzahlen ermittelt. Die Bestimmungen ergaben folgende Werte:

TABELLE II.

Bebrütungs- dauer	Fraktion	Kennzahlen		
		Säurezahl	Verseifungs- zahl	Jodzahl
unbefruchtet	Alkohol l.	8,52	180,05	113,28
	Äther l.			
	Alkohol unl.	1,13	215,15	134,16
	Äther l.			
1-2 Wochen	Alkohol l.	8,00	212,90	109,70
	Äther l.			
2-3 Wochen	Alkohol l.	9,28	198,50	113,09
	Äther l.			
3-4 Wochen	Alkohol l.	15,71	174,05	113,66
	Äther l.			

Es fällt auf, dass im Spätstadium der Eientwicklung eine beträchtliche Zunahme der freien Fettsäuren erfolgt. Die Verseifungszahl nimmt mit fortschreitender Entwicklung des Embryos allmählich ab. Es zeigt sich also, dass die neutralen Fette zum Teil den energetischen Bedürfnissen des Embryos dienen, besonders in der letzten Hälfte der Eientwicklung.

B. Der Gehalt des Riesensalamandereies an Cholesterin und Cholesterinester.

Die aus den Eiern von verschiedenen Entwicklungsperioden mit Alkohol und Äther erschöpfend extrahierten Fettsubstanzen wurden nach Fex (1920), Mühlbock und Kaufmann (1931) mit 2%-iger Natronlauge versetzt. Die Lösung wurde auf dem Wasserbad 30 Minuten lang gekocht, und dann mit Äther im Scheidetrichter extrahiert. Nach dem Verdunsten des Äthers wurde der getrocknete Rückstand zur Bestimmung des freien und gebundenen Cholesterins auf bekannte Weise nach der Digitoninmethode in Arbeit genommen. Mit Rücksicht auf die Anschauung von Thaysen (1914), Fex (1920), Dam (1928) und Kusui (1929) haben wir bei der Ausfällung des Digitonincholesterides immer über 30% Digitoninüberschuss verwendet und den Niederschlag 24 Stunden stehen gelassen. Bei der Verseifung des Cholesterin-

esters bedienten wir uns des von Windaus (1910) angegebenen, später von Thaysen etwas modifizierten Verfahrens. Dabei zeigte sich folgendes Resultat (vgl. Tabelle III):

TABELLE III.

Bebrütungs- dauer	Auf 100 Embryos berechnete Menge des			
	Alkohol l. Äther lösl. Fettstoffes g	freien Cholesterins g	Cholesterin- esters g	Gesamt- cholesterins g
unbefruchtet	1,828	0,071	0,010	0,081
1-2 Wochen	1,796	0,049	0,014	0,064
2-3 Wochen	1,566	0,038	0,012	0,051
3-4 Wochen	1,737	0,029	0,026	0,055

In vollkommenem Einklang mit dem Kusuischen Ergebnis bei Hühner- und Reptilieneiern haben wir festgestellt, dass die Esterverbindungen sich beim hochentwickelten Riesensalamander-embryo auffallend vermehren, und dass im Verlauf der Eibebrütung eine stetige Abnahme des freien Cholesterins erfolgt.

LITERATUR.

- Dam, H. (1928): Biochem. Zs., **194**, 177-188.
 „ (1930): ebenda, **220**, 158.
 „ (1931): ebenda, **232**, 269..
 Farkas, K. (1906): Pflügers Arch., **98**, 490.
 Fex, J. (1920): Biochem. Zs., **104**, 82.
 Karashima, J. (1928): Jl. of Biochem., **10**, 375.
 Kusui, K. (1929): H-S., **181**, 101.
 „ (1932): Jl. of Biochem., **15**, 319.
 Mühlbock u. Kaufmann (1931): Biochem. Zs., **233**, 222.
 Tangl, F. (1903): Pflügers Arch., **93**, 327.
 Tangl, F. u. Faras, K. (1908): ebenda, **104**, 173.
 Thannhauser, S. J. u. H. Schaber, (1923): H-S. **127**, 278.
 Thaysen, (1914): Biochem. Zs. **62**, 89.
 Windaus, (1910): H-S., **65**, 110.

ÜBER DEN SCHWEFELGEHALT DES ARTERIELLEN BZW. VENÖSEN BLUTES DES PANKREAS.

VON

SHIRO KUMAMI.

*(Aus dem physiologischen Institut der medizinischen Fakultät zu Nagasaki.
Director: Prof. Dr. D. Ogata.)*

(Eingegangen am 13. März 1933)

I. EINLEITUNG.

Die Innersekretion der Bauchspeicheldrüse ist schon lange von vielen Forschern studiert worden. In Bezug auf den Resorptionsweg des aus dem Pankreas stammenden Inkretes im normalen Zustand gibt es zweierlei Anschauungen: die lymphogene und die hämatogene Resorption. Lépine zeigte zuerst 1890, dass das amylytische Ferment aus dem Pankreas durch den Ductus thoracicus ins Blut hineindringt, und dass die Thoracicuslymphe des normalen gesunden Hundes eine antidiabetische Wirkung gegen den depankreatisierten Diabeteshund besitzt. Dann beobachtete Biedl bei der Mehrzahl von Hunden Vorkommen von Zucker im Harn, falls Unterbindung oder Fistelbildung des Brustganges ausgeführt wird. Auch Offer, Kumagai, Sato, Yamada u. viele andere stimmen mit der lymphogenen Theorie von Lépine-Biedl überein. Aus solchen Mitteilungen ersieht man, dass das Pankreashormon im normalen Zustand fast ohne Zweifel ins Lymphsystem abgesondert wird.

Auf der anderen Seite liegen auch Versuche vor, welche dafür sprechen, dass das Pankreashormon direkt auf dem Blutwege abgeführt wird. Hédon konnte 1909 zeigen, dass der Harnzucker sofort verschwindet, wenn man das Blutserum aus V. pancreatica des normalen Hundes in V. mesenterica des diabetischen injiziert, oder wenn durch kreuzweise Verbindung der Carotiden eines pankreasdiabetischen und eines normalen Hundes die Zuckerausscheidung beim ersteren zum Verschwinden gebracht werden kann. Seitdem behaupteten auch Falta, Alexander, Ehr-

mann, Gley, Carlson, Drenann, Talsa, Ginsberg u.a., dass die Insulininkretion auf dem Wege des Pfortadersystems vor sich geht.

Man kann also den Inkreationsweg des Insulins durch die Blutgefäße nicht ohne weiteres von der Hand weisen.

Vor allem wies Horning (1927) auf dem Wege histologischer Untersuchung nach, dass die Insulininkretion teilweise durch die Pankreasvenen ausgeführt werden muss. Neuerdings haben London und Kotschneff beobachtet, dass Mäuse, welchen intra-peritoneal Pankreasvenenblut des Hundes eingespritzt wurde, deutliche Hypoglykämie aufweisen. Auch Zunz u. Barre zeigten weiter, dass der Insulingehalt des Pankreasvenenblutes durch intravenöse Injektion von Traubenzuckerlösung sich vermehrt. Muto beobachtete durch seine spezifischen Präzipitationsversuche, dass die Insulininkretion auf beiden Wegen d.h. durch den Brustgang und durch die Pankreasvenen vor sich geht, und dass sie durch die letzteren mehr als durch den ersteren sezerniert wird.

Nun ist durch viele Autoren sicher klargestellt, dass die Adrenalininkretion des Nebennierenmarks durch N. splanchnicus befördert wird. 1909 stellten Eppinger, Falta u. Rudinger das Vorhandensein exzitosekretorischer Fasern im Vagus fest. Seitdem beobachteten auch Crea, Clark u.a. diesen Zusammenhang, und es besteht heute fast kein Zweifel, dass die Insulininkretion des Pankreas vom rechten N. vagus reguliert wird. Hoshi und Kiyohara in unserem Institut beobachteten auch, dass die N. vagi höchstwahrscheinlich die innersekretorischen Nerven des Pankreas darstellen, und dass im N. splanchnicus weder die Insulininkretion fördernde, noch dieselbe hemmende Fasern vorhanden sind.

Weiter ist das chemische Verhalten des Pankreashormons noch nicht völlig geklärt. Nach den Versuchen von Harington, Scott u. a. ist die Formel des Insulins $n(C_{45}H_{69}O_{14}N_{11}S + 3H_2O)$. 1925 haben Abel u. Geiling das Insulin (Lilie) analysiert und festgestellt, dass im Insulinmolekül der Schwefel relativ in grosser Menge vorhanden ist (als Gesamtschwefel 37,41%), und zwar dass 48% davon sehr locker gebunden sind, und dass wenn das Insulin diesen Schwefel verliert, auch seine hypoglykämische Wirkung ver-

schwindet. Seitdem ist das Interesse der medizinischen Welt am Pankreasproblem sehr rege geworden, und infolgedessen sind die Arbeiten darüber ins Unzählbare angewachsen. Tasaka, Buciard-Modena u.a. veröffentlichten hintereinander ihre interessanten Beobachtungen. 1932 bestimmten Nitzescu u. Georgescu den Schwefelgehalt sowohl im arteriellen als auch im pankreas-venösen Blute: im letzteren war derselbe grösser. Sie behaupteten, dass diese Schwefelzunahme in der Insulinzunahme ihren Grund haben müsse.

Die Methoden zur Bestimmung des im Blut enthaltenen Hormons sind heute schon sehr zahlreich, obgleich es noch immer nicht vollkommen rein gewonnen werden kann. Um die Physiologie und die Pathologie der inneren Sekretion des Pankreas genau und eingehend zu erforschen, muss man das Hormon im Blute, und zwar in verschiedenen Zuständen, direkt messen.

Auf Grund der obigen Mitteilungen hat Verfasser vermutet, dass der Schwefelgehalt des Blutes steigen dürfte, wenn die Insulininkretion durch verschiedene Reizungen befördert wird, und hat diesbezüglich die folgenden Versuche angestellt.

II. METHODIK DER VERSUCHE.

A. Versuchsmaterial. Zum Versuche dienten erwachsene, gesunde, gut ernährte, über 24 Stunden lang gehungert habende Hunde.

B. Narkose und Operation. Die Tiere wurden zuerst mit Morphinum hydrochloricum (1 ccm der 3%igen Lösung pro kg Körpergewicht) subkutan vorbehandelt; 30 Minuten danach führte man Laparotomie und Inzision am Halse aus. Wir nahmen Blut je ca. 15 ccm gleichzeitig aus der linken Carotis, der Jugularis und den Pankreatikoduodenalvenen. Um das Blut in genügender Menge zu erhalten, führten wir je eine kleine Glaskanüle in die Gefässe ein.

C. Versuchsmethodik. Man misst 10 ccm Blut genau durch die Vollpipette ab und mischt dazu 22 ccm destilliertes Wasser und 8 ccm 20%ige Trichloressigsäure; dann schüttelt man und lässt stehen. Nach 15 Minuten filtriert man das Gemisch durch aschfreien

Filterpapier. Aus 3 ccm des Filtrats wird die Menge des Gesamtschwefels nach dem Verfahren von Denis-Reed bestimmt.

Im folgenden seien die Hauptpunkte des Versuchs tabellarisch aufgestellt

III. VERSUCHSERGEBNISSE.

1. Schwefelgehalt des Blutes des hungernden Hundes.

Über den Gesamtschwefelgehalt des normalen Hundebutes gibt es bisher verschiedene Angaben. Nach der Arbeit von Denis u. Reed beträgt er 8,50–11,87 mg%; nach Nitzescu u. Georgescu 3,5–5,8 mg%; nach Loeper, Garcin u. Lesure 7,0–10,0 mg%, durchschnittlich 8,5 mg%.

TABELLE I.

(Schwefelgehalt des Blutes des hungernden Hundes.)

Datum	Tier Nr.	Körpergewicht (kg) u. Geschl.	Gesamtschwefel in Milligramm pro 100 ccm Hundeblut				
			Pankreas- venenblut	Carotis- blut	Jugularis- blut	Differenz	
						(P-C)	(C-J)
10/II	17	3,5 ♂	9,12	8,99	8,95	0,13	0,04
10/II	19	4,0 ♀	8,62	8,38	8,26	0,24	0,12
13/II	20	5,0 ♂	9,51	9,25	9,23	0,26	0,02
13/II	21	3,3 ♂	8,99	8,81	8,71	0,18	0,10
Durchschn.		3,95	9,06	8,86	8,79	0,20	0,07

P: Pankreasvenenblut; C: Carotisblut; J: Jugularisblut

Wie man aus obiger Tabelle ersieht, stimmen meine Ergebnisse fast mit den Angaben von Loeper u.a. überein. Der Schwefelgehalt des Pankreasvenenblutes ist durchschnittlich um 0,20 mg d.h. um 2,3%, höher als der des Carotisblutes; und der des Jugularisblutes, welches als Kontrolle gemessen wird, kommt fast dem des Carotisblutes gleich, oder ist eher geringer, nämlich um 0,07 mg d.h. 0,9%. Diese Unterschiede stimmen fast mit den Angaben von Nitzescu u. Georgescu überein.

2. *Schwefelgehalt des Blutes des Hundes 2 Stunden nach Nahrungsaufnahme.*

Nach den Arbeiten von London, Kotschneff u.a. hängt der Insulingehalt des Pankreasvenenblutes in hohem Masse von der Art der Nahrungsstoffe ab; bei ausschliesslicher Brotfütterung steigt er am meisten, bei den Tieren aber, die dazu mit reichlichem Fett genährt werden, steht er am niedrigsten. Also wurden alle Versuchstiere zugleich mit Fleisch, Fisch und Reis, welchem etwas Gemüse zugemischt war, gefüttert.

TABELLE II.
(Schwefelgehalt des Hundblutes 2 Stunden nach Nahrungsaufnahme.)

Datum	Tier Nr.	Körpergewicht (kg) u. Geschl.	Zeit n. Nahrungsaufn.	Gesamtschwefel in Milligramm pro 100 ccm Hundeblood		
				Pankreas- venenblut	Carotis- blut	Differenz (P-C)
14/I	1	9,0 ♂	2 Std.	9,13	8,45	0,68
19/I	2	6,0 ♂	2 Std.	9,81	9,49	0,32
21/I	3	5,0 ♂	2 Std.	9,19	8,54	0,65
23/I	4	4,55 ♀	2 Std.	9,35	8,97	0,38
24/I	5	4,2 ♂	2 Std.	8,97	8,58	0,39
Durchschn.		5,75	2 Std.	9,29	8,81	0,48

P: Pankreasvenenblut; C: Carotisblut.

Ein Vergleich mit Tabelle I zeigt, dass der Schwefelgehalt hier stets grösser ist als beim hungernden Hunde; die Differenz zwischen beiden Gruppen betrug durchschnittlich 0,28 mg, d.h. der Schwefelgehalt vermehrt sich um ca. 50%.

3. *Schwefelgehalt im Blute des Hundes, bei welchem der N. vagus gereizt wurde.*

Der Hund wurde auf dem Operationstisch festgebunden und unter Äthernarkose in folgender Weise operiert. Zuerst machten wir Laparotomie; unter künstlicher Atmung eröffneten wir dann den rechten unteren Brustkorb und suchten die N. vagi, welche parallel mit dem Oesophagus verlaufen, steckten sie in die Elektro-

den reizten sie 3 Minuten lang mit dem Induktionsstrom (R.A. 10 cm, Trockenelement 1,5 V.). Wir entnahmen das Blut 1 Minute nach dem Reizungsbeginn gleichzeitig aus der Carotis und den Pankreasvenen durch Kanüle.

TABELLE III.

(Schwefelgehalt im Blut des Hundes, bei welchem N. vagus gereizt wurde.)

Datum	Tier Nr.	Körpergewicht (kg) u. Geschl.	Reizungsdauer	Zeit der Blutentnahme u. Reizungsbeginn	Gesamtschwefel in Milligramm pro 100 cem Hundelblut		
					Pankreasvenenblut	Carotisblut	Differenz (P-C)
30/I	7	5,5 ♂	3 Min.	1 Min.	9,13	8,41	0,72
31/I	8	4,3 ♀	3 Min.	1 Min.	11,06	10,44	0,62
2/II	9	4,5 ♂	3 Min.	1 Min.	9,71	8,78	0,93
2/II	11	2,9 ♀	3 Min.	1 Min.	9,23	8,39	0,83
3/II	12	2,4 ♀	3 Min.	1 Min.	9,61	9,08	0,53
Durchschn.		3,92	3 Min.	1 Min.	9,75	9,02	0,73

P: Pankreasvenenblut; C: Carotisblut.

Nach obiger Tabelle nahm in allen 5 Fällen der Schwefelgehalt des Blutes, sowohl des arteriellen als auch des venösen, zu. Im Pankreasvenenblut betrug die Zunahme durchschnittlich 0,69 mg, d. h. ca. 7,6%, im Carotisbut aber nur 0,16 mg, d. h. ca 2%, und zwar betrug die Differenz zwischen den beiden Blutarten 0,53 mg, d. h. der Schwefelgehalt vermehrt sich im Verhältnis von 1:2,7.

4. Schwefelgehalt im Blut des Hundes, bei welchem *N. splanchnicus* gereizt wurde.

Man hatte vorher die Splanchnicusfasern 1 cm oberhalb des Plexus solaris durchschnitten und reizte den peripheren Stumpf in ganz gleicher Weise wie oben erwähnt. Nach den Versuchen von Loeper, Decourt u. a. modifiziert die Nebennieren Exstirpation die Oxydation des Schwefels. Also hatte man vorher neben dem Plexus solaris die Fasern zur Nebenniere durchschnitten, so dass die Reizung nicht weiter geleitet wurde. Wie aus Tabelle IV ersichtlich, blieb der Schwefelgehalt des Blutes fast unverändert.

TABELLE IV.

(Schwefelgehalt im Blut des Hundes, bei welchem N. splanchnicus gereizt wurde.)

Datum	Tier Nr.	Körpergewicht (kg) u. Geschl.	Reizungsdauer	Zeit der Blutentnahme n. Reizungsbeginn	Gesamtschwefel in Milligramm pro 100 ccm Hundeblut		
					Pankreasvenenblut	Carotisblut	Differenz (P-C)
6/II	10	3,4 ♀	3 Min.	1 Min.	9,31	9,16	0,15
7/II	13	5,5 ♂	3 Min.	1 Min.	9,02	8,73	0,29
8/II	14	4,5 ♀	3 Min.	1 Min.	9,17	9,06	0,11
9/II	16	3,7 ♀	3 Min.	1 Min.	8,98	8,80	0,18
Durchschn.		4,275	3 Min.	1 Min.	9,12	8,94	0,18

P: Pankreasvenenblut; C: Carotisblut.

IV. DISKUSSION.

Loeper, Garcin, Lesure u.a. fanden im Blut des Hundes im normalen Zustand 0,1% Schwefel (20% als neutraler, 80% als oxydierten Schwefel). Seine Quelle befindet sich nach ihnen äusserlich im Nahrungstoff, innerlich in der physiologischen Zersetzung von Körperzellen, besonders in Hämolysen; der Schwefelgehalt des Blutes im normalen Zustand ist immer fast konstant und seine Schwankung ist geringgradig. Als die Orte, wo der Schwefelstoffwechsel reguliert wird, wiesen Loeper u.a. auf die Leber und die Nebenniere.

Wie aus Tabelle I ersichtlich, ist selbst während der Hungerzeit der Schwefelgehalt des Pankreasvenenblutes immer, wenn auch kaum merklich, höher als der des Carotisblutes. Im Jugularisblut ersieht man fast keine Veränderung des Schwefelgehaltes, eher findet sich, wenn auch nur in sehr leichtem Mass, eine Neigung zur Verminderung. Wie weiter aus Tabelle II ersichtlich, steigt 2 Stunden nach der Nahrungsaufnahme der Schwefelgehalt ziemlich deutlich an, besonders im Pankreasvenenblut. Wenn man den Schwefelgehalt des Blutes nach Vagusreizung mit dem des normalen Hundes vergleicht, sieht man bei dem ersteren eine deutliche Zunahme. Zuletzt, wie aus Tabelle IV ersichtlich, verändert sich

durch Splanchnicusreizung der Schwefelgehalt fast gar nicht. Aus diesen Ergebnissen kann man schliessen, dass die Splanchnicusreizung keinen Einfluss auf den Schwefelstoffwechsel hat.

Nun behaupten London, Kotschneff, Brugseh, Horsters u. a., dass während der Hungerzeit Insulin weder in den peripheren noch in den Pankreasvenen vorhanden ist. Dagegen sind Hoshi, Yamada, Biedl, Alexander u. a. der Meinung, dass das Pankreashormon im Blute des hungernden Hundes in fast gleicher Menge wie in dem normalen vorhanden ist.

Weiter haben London, Pollack, Jorns u. a. mitgeteilt, dass das Insulin des Blutes nach Nahrungsaufnahme zunehme. Nach Pollack erreicht die Insulininkretion 1–2 Stunden, nach Jorns 2–3 Stunden, nach London 3–6 Stunden nach dem Essen ihren höchsten Wert. Auch Zunz u. Barre, wie oben erwähnt, beobachteten die Zunahme des Insulingehalts im Pankreasvenenblut durch Injektion von Traubenzuckerlösung, und dass diese Zunahme 1–3 Stunden nach der Injektion den maximalen Punkt erreicht.

Ausser den Autoren, welche schon in der Einleitung genannt sind, berichteten auch Zunz u. Barre, dass der Insulingehalt des Pankreasvenenblutes durch die Reizung des rechten N. vagus zunimmt. Über den Einfluss der Splanchnicusreizung auf den Insulinstoffwechsel weiss man im allgemeinen noch nichts Bestimmtes, und viele Autoren vermuten heute, dass sie auf die Insulininkretion keine Wirkung hat.

Vergleicht man die Schwefelgehaltzunahme des Blutes in meinen Versuchen mit der Insulingehaltzunahme, welche viele Forscher beobachtet haben, so findet man sofort einen schönen Parallelismus zwischen den beiden. Besinnt man sich weiter, dass der Schwefelgehalt des Blutes im normalen Zustand sehr konstant ist, so ergibt sich daraus die Folgerung, dass die Schwefelzunahme im Blute mit der Insulinzunahme stets Hand in Hand geht.

Überdies gibt nach der Arbeit von Takeuchi das Hundepankreas auf den Insulingehalt bezogen von den verschiedenen Tiere die höchste Ausbeute, und nach Kubo ist das Pankreas zusammen mit Leber und Nebenniere von allen Körperorganen am schwefelreichsten. Nach diesen Ergebnissen glaubt Verfasser

folgern zu können, dass im Pankreasvenenblut die Schwefelzunahme immer deutlicher als im Carotisblut ist, was seine Anschauung, dass das Insulin in den Pankreasvenen sezerniert wird, wie auch Hédon und andere behaupten, weiter bestätigen würde.

Also stimmt meine Meinung mit der von Nitzescu u. Georgescu überein. Wie aus Tabelle I ersichtlich, ist es höchst wahrscheinlich, dass die Insulininkretion selbst während der Hungerzeit stattfindet. Nach meiner Meinung wird das Insulin im normalen Zustand in den Pankreasvenen sezerniert und wird durch das Herz, wo es stark verdünnt wird, weiter zur Peripherie getragen; daher ist auch der Schwefelgehalt im Carotisblut geringer als im Pankreasvenenblut und am geringsten im Jugularisblut.

Doch möchte Verfasser die Ansicht, dass die Insulininkretion durch den Brustgang vor sich geht, wie viele Autoren behauptet haben, heute nicht gerade negieren; aber seiner Meinung nach wird wenigstens ein Teil vom Insulin offenbar durch die Pankreasvenen direkt ins Blut abgesondert. Ob der Abfluss des Insulins nur durch die Blutbahn oder nach Muto's Beobachtung auch durch die Lymphbahn vor sich geht, bleibt bis auf weitere Versuche dahingestellt.

V. ZUSAMMENFASSUNG.

Auf Grund seiner Versuche kommt Verfasser zu folgenden Schlüssen.

1. Der Gehalt an Gesamtschwefel ist im Pankreasvenenblut grösser als im Pankreasarterienblut, sowohl im normalen Zustand als auch im hungernden.

2. Dieser Unterschied wird durch Nahrungsaufnahme deutlich gesteigert.

3. Die Vagusreizung hat gleicherweise eine Steigerung zur Folge. Die Splanchnicusreizung ist dagegen ganz erfolglos.

4. Verfasser ist der Meinung, dass diese Zunahme des Gesamtschwefelgehalts im Pankreasvenenblut wenigstens zum Teil infolge der Inkretionssteigerung erfolgt. Er vermutet also, dass das Insulin teilweise auf der Blutbahn abgeführt wird.

THE POTENTIOMETRIC STUDY ON THE SCHARDINGER REACTION.

By

JUN-ICHI TOYAMA.

*(From the Institute of Medical Chemistry Kyushu Imperial University,
Fukuoka. Director: Prof. Dr. K. Kodama.)*

(Received for publication, March 25, 1933)

Clark (1925) carried out an experiment on the Schardinger enzyme in fresh milk, and stated that milk treated with aldehyde in absence of methylene blue becomes activated in such a way as to give a high reduction potential, which is not given by the aldehyde alone or by aldehyde plus boiled milk. Repeating this experiment, Kodama (1926) was unable to confirm these potential changes either with fresh milk or with the purified preparation of the enzyme. In reply to Kodama, Clark (1927) emphasized repeatedly a decided acceleration in the potential change when formaldehyde, salicylaldehyde or benzaldehyde was added to deaerated milk, and ascribed the failure of Kodama to the incomplete exclusion of oxygen from the reacting system.

The author repeated the experiment once more to see whether the discrepancy of Kodama's result is simply a matter of oxygen or not and came to the conclusion that in the case of formaldehyde the nature of electrode metal had a great influence on the results observed by both investigators.

For the determination of the reduction potential, the vacuum electrode vessel of Kodama and Dixon with double side-compartments was used, which was fully described by Tsukano (1932).

As the electrode a blank platinum or gold plate was used. As the half cell quinhydrone electrode, composed of the acetate buffer (pH=4.6) and a few crystals of quinhydrone was used. E.M.F. was measured with the unipivot potentiometer of the Cambridge Instrument Company. The reading is accurate to 1 millivolt. The Schardinger enzyme used in the experiments, was isolated from

milk by the author's method, which was already published in *The Journal of Biochemistry* (1933).

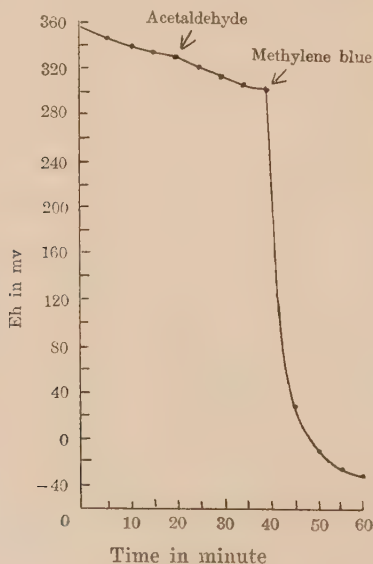
EXPERIMENT 1.

10.0 cc. of enzyme solution prepared by dissolving 0.05 gm. of the enzyme in 10.0 cc. of the phosphate buffer (pH=8.0) are pipetted into the main vessel. Into one side compartment was introduced 2.0 cc. of 2% acetaldehyde, and into another, 3.0 cc. of *M*/5,000 methylene blue. All of the glass joints were made air tight by means of cock grease, the vessel was then evacuated to 2.5 mm. for 3 minutes and placed in a thermostat kept at 21°C..

When the potential of the platinum electrode, dipped in the enzyme solution showed a stationary value, the acetaldehyde solution was poured into it by overturning the side vessel and then the potential change was followed every minute. No abrupt change as expected from the work of Clark was obtained, but at the addition of methylene blue this was really the case, as is shown in Fig. 1.

Fig. 1.

The oxidation-reduction potential of the system:—
Schardinger enzyme + acetaldehyde + methylene blue.



The argument that the failure of the development of the reduction potential on the addition of acetaldehyde may be due to the trace of oxygen can be denied, because the reduction of methylene blue was not hindered to the slightest extent in the above reaction system.

A plausible explanation here perhaps may be sought in the "launenhafte" nature of the electrode surface which was unable to react with the activated hydrogen of acetaldehyde molecule but reacted readily with leuco-methylene blue. On the "Launigkeit" of the electrode, however, we have no intimate knowledge. About this, Kodama put forward a hypothesis that the dehydrogenation of acetaldehyde molecule may be a coupled reaction; in other words this reaction proceeds only when a certain amount of free energy is available which develops by the unit of activated hydrogen and its acceptor. But, whether all dehydrogenating processes in the living tissue are coupled reactions or not is a question.

For example, the activated hydrogen of *succinic* acid can be well demonstrated by the potentiometric method without adding special H_2 -acceptor, though the presence of natural H_2 -acceptor such as glutathione or cytochrome-like substance is not excluded. For the "launenhafte" nature of the electrode the experiment with formaldehyde brought about an interesting case.

EXPERIMENT 2.

We repeated the above mentioned experiment with the gold electrode instead of the platinum. The result is exactly the same as seen in Fig. 2.

EXPERIMENT 3.

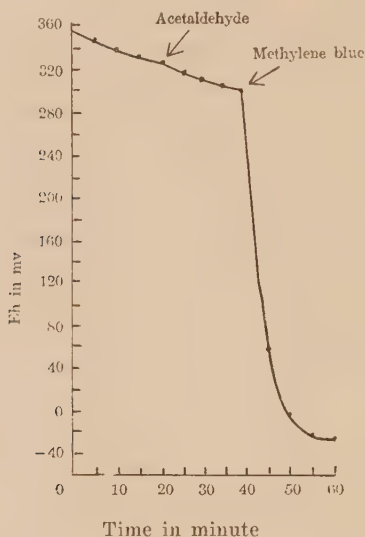
The experimental procedures are quite the same as the foregoing, except 20 cc. of 2% formaldehyde were added instead of acetaldehyde. Here again both platinum and gold electrode were compared.

The results are illustrated in Fig. 3.

A most remarkable thing in the above figure is the prompt development of reduction potential on the addition of formaldehyde

Fig. 2.

The oxidation-reduction potential of the system:—
(gold electrode) Schardinger enzyme + acetaldehyde + methylene blue.



when platinum electrode was used, while this is not so marked with gold electrode. Then the question arises whether this behavior of formaldehyde toward platinum electrode is caused by the real activation by means of Schardinger enzyme or simply by something in the chemical reaction between formaldehyde and the surface of the electrode. To answer this, the next control experiments were undertaken.

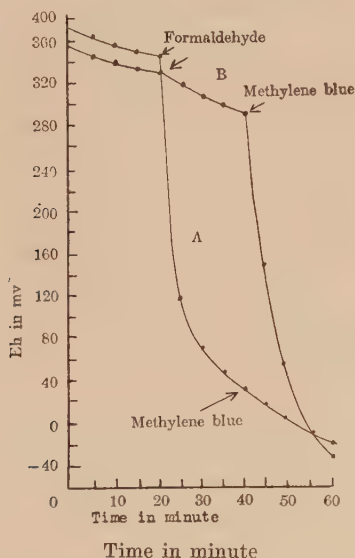
EXPERIMENT 4.

Into the reaction vessel 15.0 cc. of the phosphate buffer, and, into the side compartment, 2.0 cc. of 2% formaldehyde, the vessel was evacuated and placed in the thermostat kept at 21°C. When the potential showed a constant value, formaldehyde was added and the potential change was observed every 5 minutes. The results are shown in Fig. 4.

From the above figure it is apparent that phosphate buffer

Fig. 3.

The oxidation-reduction potential of the system:—
Schardinger enzyme + formaldehyde + methylene blue.



A Formaldehyde with platinum electrode.

B Formaldehyde with gold electrode.

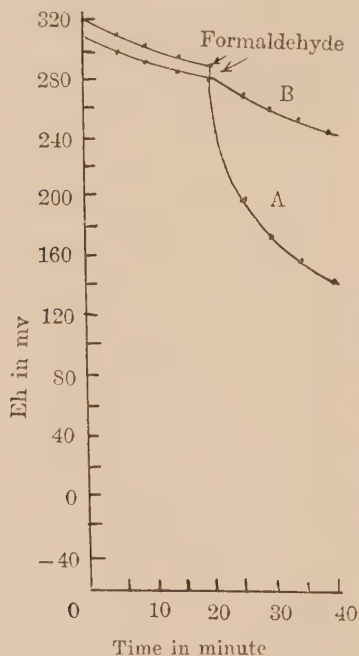
(pH=8.0) + formaldehyde alone gave a fairly noticeable reducing effect toward the platinum electrode, but not toward the gold electrode. Comparing the magnitude of the reduction potential developed in the presence of the enzyme and in its absence, however, we notice that it was far greater in the former case. We are glad therefore to confirm here only with the platinum electrode the result informed by Clark and his colaborers, although the gold electrode entirely refused to do this. The reason why both metal electrodes show such a deviating behavior toward formaldehyde can not be answered at present.

At any rate, we are justified in saying that formaldehyde has a special affinity toward platinum rather than toward gold.

Next, we repeated similar experiments with benzaldehyde and salicylaldehyde, as it seems interesting to know what attitude other

Fig. 4.

The oxidation-reduction potential of the system:—
phosphate-buffer (pH = 8.0) + formaldehyde.



A Formaldehyde with platinum electrode.

B Formaldehyde with gold electrode.

aldehydes exhibit toward both electrodes. They were also investigated by Clark with the same result as formaldehyde.

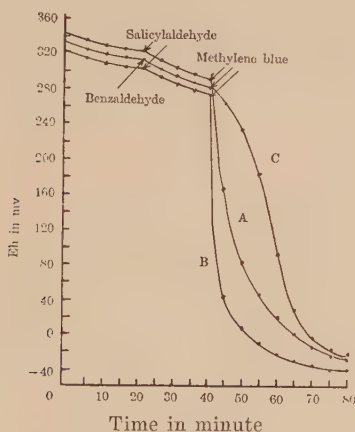
EXPERIMENT 5.

The experimental procedure is quite the same as the foregoing one. The reaction system consists of 10.0 cc. of the enzyme solution, 0.5 cc. 0.1% salicylaldehyde and 2.0 cc. *M*/5,000 methylene blue, and the reactions-temperature was 36°C. The results of salicylaldehyde with both electrodes were illustrated in Fig. 5.

From the above figures we confirm that no potential drift occurred at the addition of these aromatic aldehydes.

Fig. 5.

The oxidation-reduction potential of the system:—
Schardinger enzyme + aromatic aldehyde + methylene blue.



- A Salicylaldehyde with platinum electrode.
B Salicylaldehyde with gold electrode.
C Benzaldehyde with platinum electrode.

SUMMARY

1. The purified Schardinger enzyme caused no apparent drift toward reduction-potential on the addition of acetaldehyde, salicylaldehyde or benzaldehyde, whether platinum or gold electrode was used.

2. When methylene blue was added such an abrupt drift was observed.

3. Formaldehyde alone gives a certain reducing effect toward the platinum electrode.

This was intensified by the presence of the Schardinger enzyme. But on gold electrode no such an effect was observed.

I wish to express my indebtedness to Prof. K. Kodama for his kind direction and encouragement during my experiments.

REFERENCES.

- Clark, W. M. and Sullivan, M. X. (1927): supplement No. 66 to the Public Health Reports.
Kodama, K. (1926): *Biochem. J.*, **20**, 1095.

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE VERTEILUNG DER KOHLEHYDRATE IN DEN ORGANEN UND GEWEBEN BEI DER INSULIN- UND SYNTHALIN-HYPOGLYKÄMIE, BEIM HUNGER SOWIE BEI FUNKTIONS- STÖRUNGEN DER LEBER.

VON

KATSUMICHI MATSUURA.

(Aus dem Biochemischen Laboratorium des Präfektur-Hospitals zu Kobe.
Vorstand: Dr. M. Takeda.)

(Eingegangen am 27. März 1933.)

I. EINLEITUNG.

Synthalin ist bekanntlich ein von Frank, Nothmann, Wagner u. a. synthetisch hergestelltes Guanidinderivat mit blut- und harnzuckersenkender Wirkung. Seine Giftigkeit ist nicht wesentlich höher als die des Guanidin. Frank u. a. nehmen an, dass das Synthalin bezüglich des Wirkungsmechanismus im Kohlehydrat-Haushalt dem Insulin gleichkommt. Den Wirkungsmodus des Synthalin in diesem Haushalt haben manche Autoren schon experimentell wie klinisch verschiedentlich untersucht und darüber berichtet. Ob das Synthalin im Wirkungsmechanismus tatsächlich dem Insulin gleich zu stellen ist, darüber gehen die Auffassungen aber heute noch recht weit auseinander.

Eine Reihe von Autoren haben sich bestrebt, in Bezug auf den Wirkungsmodus Unterschiede zwischen beiden Stoffen zu finden: z. B. in bezug auf biochemische Veränderungen in den Körperflüssigkeiten und in den Organen (Jansen u. Baur, Staub, Rodo u. Marks, Ralli, Elaine u. Tiber, Barrensheen u. Eisler, Arndt, Müller u. Schemann); oder den Resultaten bei Gasstoffwechsel-Untersuchungen Rechnung tragend (Jansen u. Baur, Klein u. Weiss, Karr, Walter u. Schumann, Staub, Rodo u. Marks); oder auf das Ergebnis der Untersuchungen an Organen hin (Salén, Ernst u. Nyrén, Rodo u. Marks, Ahlgren);

ferner auf Grund histologischer Befunde (Hornung u. Stanislaw, Arndt, Müller u. Schemann, Morawitz u. Adler, Bödeker u. Junkersdorf, Staub, Rodo u. Marks, Simola, Karr, Belk u. Petty, Ochiai).

Aus den Resultaten der zahlreichen Untersuchungen lassen sich den Wirkungsmodus des Synthalin betreffend folgende Gesichtspunkte entnehmen:

1. Die Wirkung des Synthalin ist der des Insulin vollkommen gleich.

2. Ganz anders als Insulin verfügt aber Synthalin über keine Regulation im Kohlehydratstoffwechsel. Die Synthalinwirkung unterscheidet sich von der Insulinwirkung prinzipiell dadurch, dass sich der durch Einwirkung des Synthalin verlorengelungene Zucker ausschliesslich nur auf anoxybiotischem Wege zu Milchsäure umwandelt. Synthalin wird deshalb nichts anderes als ein Zellgift sein.

3. Synthalin bewirkt, auf dem Umweg über das vegetative Nervensystem, Förderung der Insulinsekretion im Tierkörper.

Bezüglich des Wirkungsmechanismus des Synthalin herrscht also heute noch keine einheitliche Ansicht.

Um die Unterschiede in den sich im Kohlehydratstoffwechsel abspielenden Wirkungsmechanismen zwischen Insulin und Synthalin besser beurteilen zu lernen, habe ich nun neue Versuche angestellt, in denen wir das Kaninchen der Wirkung grösserer Synthalingaben überlassen und den Verlauf der dadurch ausgelösten hypoglykämischen Erscheinungen genau verfolgt haben. Zugleich haben wir auch alle erdenklichen Untersuchungen über die biochemischen Veränderungen im Blut vorgenommen. Weiterhin haben wir, stets unter Berücksichtigung von Kontrolluntersuchungen am Insulintiere, auf diejenige Substanz zu fahnden versucht, welche zur Beseitigung des hypoglykämischen Komplexes recht gut wirksam ist. Diese Experimente habe ich schon in einer japanischen medizinischen Zeitschrift "Nippon Naika Gakkai Zasshi" 1933, Bd. 21, No. 4 veröffentlicht, wobei wir zusammenfassend zu folgenden Schlüssen gekommen sind:

1. Der Blutzuckerspiegel des Synthalintieres bewegt sich in

recht weiten Grenzen, zwischen 20–50 mg%.

Unter insgesamt 50 Synthaltintieren sinkt bei 26 der Blutzuckerspiegel erst nach vorhergegangener temporärer Steigerung wesentlich, während er bei den übrigen Tieren ohne weiteres fällt. Beim Insulintier bleibt jedoch eine derartige Hyperglykämie völlig aus.

2. Simultan mit dem Eintritt der hypoglykämischen Erscheinungen setzt beim Insulintier ein Temperaturabfall ein, jedoch mit Ausnahme der sehr heissen Sommermonate. Beim Synthaltintier ist er aber selbst in der heissen Zeit noch zu beobachten.

Beim Insulintier, bei dem übrigens Glukoseinjektion die Krämpfe (bzw. Lähmungen) leicht zum Verschwinden bringt, steigt die gefallene Körpertemperatur mit der Blutzuckererhöhung wieder langsam an. Die Rückkehr der gefallenen Körperwärme findet jedoch beim Synthaltintier, auch wenn die Glukosezufuhr die Intensität der hypoglykämischen Symptome hätte beseitigen können—dies kommt übrigens nur ganz selten vor——, keineswegs statt.

3. Die Vergleichsuntersuchungen der blutchemischen Veränderungen im Synthalin- und Insulintier lassen sich wie folgt zusammenfassen:

a. Analog dem Insulintier bleibt die nach Synthalininjektion an Intensität zugenommene Verminderung des Serum-Refraktionswertes und des Hämoglobingehaltes bis zum Eintritt der hypoglykämischen Erscheinungen in aller Deutlichkeit bestehen.

b. Der K/Ca-Wert des Serums ist beim Synthaltintier meist erniedrigt, dagegen beim Insulintier eher erhöht.

c. Der Cl-Gehalt des Blutplasmas schwankt beim Insulintier nicht wesentlich, während er im Synthaltintier bis zu der Zeit hinuntergeht, zu der der hypoglykämische Komplex eintritt. Dass aber diese Abnahme im Synthaltintier ursächlich nichts mit dem Eintritt einer hypoglykämischen Erscheinung zu tun hat, kann man leicht dadurch erkennen, dass das gleichartige Symptom auch beim Tiere, in dem der Cl-Gehalt des Plasmas vorher durch intravenöse Kochsalzinfusion in die Höhe getrieben worden war, ebenso

gut herbeigeführt werden kann.

4. Den hypoglykämischen Komplex beim Insulintier zu beseitigen ist man dadurch imstande, dass man entweder Glukose-lösung oder eine Lösung einer der chemisch der Glukose verwandten Hexosen oder auch eine Lösung derjenigen Substanzen, welche sich im Organismus unter Aufspaltung oder auf synthetischem Wege zu Glukose umwandeln können, parenteral dem Tiere zuführt (Takeda, Sugawara u. Tsunekawa). Ganz besonders gilt dies aber für das Synthaltier, bei dem die Glukosebehandlung prinzipiell versagt und nur ganz vereinzelt einen wenn auch guten, jedoch vorübergehenden Erfolg bringt. Die Tiere gehen trotzdem bis zum nächsten Morgen sämtlich zugrunde.

5. Aus dem Gesagten ist wohl verständlich, dass in bezug auf den hypoglykämischen Komplex offenbar grundlegende Unterschiede zwischen Insulin und Synthalin bestehen. Am auffallendsten ist der Unterschied, dass das hypoglykämische Symptom beim Insulintier sicher durch Glukoseinjektion beseitigt werden kann; beim Synthaltier dagegen kaum.

Bei den Überlegungen über den Grund für diese markante Differenz wurde angenommen, dass das hypoglykämische Symptom beim Insulintier deshalb durch Zuckerzufuhr leicht beseitigt werden kann, weil das Phänomen offenbar in den Organen und Geweben seine Ursache hat, und dass es beim Synthaltier deshalb ungünstig verläuft, weil es sich dabei ursächlich wohl nicht allein um Zuckerabnahme im Gesamtorganismus handelt. Es musste somit ein anderer wesentlicher Faktor mitspielen.

Diese Erwägung erscheint um so mehr berechtigt, je genauer man obige Untersuchungsergebnisse betrachtet. Zur Sicherstellung dieser Annahme ist es auch von Belang, dass man den Zuckerwert bei Einzelfällen in verschiedenen Organen und Geweben bestimmt und die erhaltenen Werte miteinander vergleicht.

Hiervon ausgehend haben wir Untersuchungen über die Verteilung der Kohlehydrate, und zwar von wahren und Restzucker sowie von Glykogen in den Organen und Geweben vorgenommen.

Die erste Arbeit über Zuckerbestimmung in den Organen und Geweben beim Insulintier stammt meines Wissens von Hetenyi

(1925), der bei Vergleichsversuchen mit dem Guanidintier darauf hinwies, dass die Leber des Insulintieres im Kohlehydrathaushalt—im Gegensatz zu dem Guanidintier—sich besonders verhält, und zwar sich bestrebt, während der stärksten Verminderung des Blut-, Organ- und Gewebszuckers die Ausschwemmung des Leberzuckers in den Kreislauf hintanzuhalten. Es wurden aber von Hetenyi nur Gesamtreduktionswerte bestimmt. Beachtenswert ist aber, dass die Organe bzw. das Gewebe—im Gegensatz zum Blut—ausser Zucker noch andere reduzierbare Stoffe in nicht geringer Menge enthalten, so dass eine blosser Bestimmung der Gesamtreduktion von nur geringer Bedeutung ist. Es fragt sich deshalb, ob es sich bei Hetenyi ausschliesslich um wahren Zucker gehandelt hat. Eine Klarstellung der korrelativen Beziehungen dieser Zuckerarten ist daher am Platze.

Im Hinblick auf diese Umstände haben wir beim Insulin- und Synthalintier Bestimmungen des Gesamtreduktionswertes sowie des wahren und Restzuckers, ferner des Glykogengehaltes vorgenommen. Angestellt wurden auch Kontrollversuche an hungernden und leberfunktionsgestörten Kaninchen.

II. EXPERIMENTELLES.

Als Versuchstiere dienten uns über 2 kg schwere Kaninchen, die über 12 Stunden lang gehungert hatten. Das Synthalin wurde zwecks Reinigung in der Weise verarbeitet, dass die Tabletten in einer mit wenig Wasser beschickten Schale von dem übergezogenen Silberhäutchen befreit und in ca. 5 ccm Wasser emulgiert wurden. Diese Aufschwemmung wurde dann dem Versuchstier entweder am Rücken subcutan eingespritzt oder mit Hilfe eines Katheters per os in den Magen gebracht.

Die verabreichte Synthalinmenge, die für das Auftreten des ausgesprochenen hypoglykämischen Komplexes erforderlich war, wurde durch diesen Vorversuch bei 2,0–2,5 kg schweren Kaninchen bei 20 mg und bei Tieren von 2,5–3,0 kg Körpergewicht bei 30 mg ermittelt.

Deutliche hypoglykämische Erscheinungen bietende Synthalintiere wurden nach Durchschneidung der Carotis durch

Verblutungstod ad exitum gebracht. Das Tier wurde geöffnet, Organe und Gewebe entnommen und der Wirkung einer Papainlösung ausgesetzt, um das Versuchsmaterial zur Digestion zu bringen. Die Zuckerbestimmung in den so erhaltenen Lösungen erfolgte dann nach der Doi'schen Wahrer-Zuckerbestimmungsmethode (Hefemethode), um damit die Werte der Gesamtreduktion und des wahren bzw. Restzuckers festzustellen.

Bei dieser Bestimmung hat es sich aber herausgestellt, dass das verwandte Papain an und für sich eine nicht geringe Menge reduzierender Substanzen enthält. Aus diesem Grunde haben wir genau den Reduktionswert des gereinigten Papains ermittelt, wobei sich ergab, dass dieser Wert je nach der Konzentration der Papainlösungen ziemlich wechselt, und zwar in höherer Konzentration grösser ist.

Hierauf haben wir weitere Versuche vorgenommen, in denen wir das Muskelgewebe mit Papainlösungen absteigender Konzentration zur Genüge vorbehandelt und an jeder Portion die Reduktionswerte, und zwar namentlich den Gesamtreduktionswert und den wahren- bzw. Restzucker, genau bestimmt haben. Auf diese Weise waren wir nun imstande festzustellen, welche Konzentration der Lösungen für weitgehendste Verdauung des Muskelgewebes am besten geeignet ist. Ähnliche Versuche haben wir noch mit Aufschwemmungen von mazeriertem Muskelgewebe in 0,8% NaCl und Wasser angestellt.

Die Resultate gehen aus der folgenden Tabelle hervor:

TABELLE I.

Nr.	Untersuchtes Material	Gesamt- reduktions- wert mg %	Rest- reduktions- wert mg %
A	1 ccm 1% Papainlösung + 0,5 g Muskel	128,6	69,8
B	„ 0,1% „ + „ „	68,2	29,5
C	„ 0,01% „ + „ „	39,0	17,6
D	Extrakt v. 0,5 g Muskel mit 0,8% NaCl	35,1	14,8
E	„ „ „ „ destill. Wasser	36,8	14,8
A'	1% Papainlösung allein	60,0	27,0
B'	0,1% „ „	9,0	4,4
C'	0,01% „ „	3,8	4,0

Aus diesen Resultaten ergibt sich ein Reduktionswert des Muskelgewebes wie folgt:

TABELLE II.

Nr.	Untersuchtes Material	Gesamt- reduk- tionswert mg %	Rest- reduk- tionswert mg %	Wahrer- Zucker- wert mg %
A	Mit Zusatz von 1% Papainlösung	68,6	42,8	25,8
B	„ „ „ 0,1% „	59,2	25,1	34,1
C	„ „ „ 0,01% „	34,2	13,4	20,8
D	Extrakt v. Muskel mit 0,8% NaCl	35,1	14,8	20,8
E	„ „ „ „ destill. Wasser	36,8	14,8	22,0

Wie aus der vorstehenden Tabelle ersichtlich ist, sind die erzielten Reduktionswerte bei dem mit einer stark verdünnten etwa 0,01% igen Papainlösung versetzten und bei dem mit 0,8% NaCl oder destilliertem Wasser extrahierten Muskelgewebe fast die gleichen. Es bestehen also fast keine Unterschiede zwischen beiden Zusätzen. Bei der Vorverdauung des Muskelgewebes mit einer 1% igen Papainlösung wurden auch fast die gleichen Resultate erzielt wie bei der Anwendung einer 0,1% igen Papainlösung, wobei jedoch die Reduktionswerte in diesem Fall (0,1 u. 1% Papainlösung) etwas grösser als die Reduktionswerte der 0,01% Papainlösung oder der Aufschwemmung in NaCl u. Wasser sind. Diese Verhältnisse lassen sich dadurch erklären, dass vielleicht eine durch Einwirkung des Papain von dem gebundenen Zucker in Freiheit gesetzte Zuckerart dafür verantwortlich ist. In einer 1% igen Papainlösung sind an sich schon ziemlich reichlich reduzierende Substanzen vorhanden, hingegen nur ganz wenig in einer 0,1% igen Lösung. Zieht man aber die erhaltenen Reduktionswerte der an reduzierenden Substanzen reichen Lösungen von dem gefundenen Gesamtreduktionswerte ab, so bleibt eine Ungenauigkeit. Aus diesem Grunde haben wir uns nur einer 0,1% igen Papainlösung zur Verdauung des Versuchsmaterials bedient. Andererseits haben wir nach vorhergegangener Hydrolyse des zu untersuchenden Materials nach der Methode von Suto, Iwasaki und Mori den

Glykogengehalt als Zucker (den Zuckerwert nach der Hagedorn-Jensen'schen Methode bestimmt) geschätzt.

III. DIE RESULTATE DER UNTERSUCHUNGEN.

Um festzustellen, ob das Kaninchen, das durch Überdosierung von Synthalin bzw. Insulin einmal zu hypoglykämischen Erscheinungen, und zwar zu Krämpfen, Lähmungen der Extremitäten usw. geführt worden war, sich wieder spontan erholen kann, wurde das Tier 10 Minuten nach Auftreten der Symptome durch Verbluten getötet. Einerseits wurde der Gehalt der Organe—Leber, Niere, Lunge und Gehirn—und der Gewebe—Muskelgewebe—an Zucker (Gesamt- und Restreduktion sowie Wahrer-Zuckerwert), ferner an Glykogen sofort bestimmt. Andererseits wurde der Blutzucker in ein und demselben Tier so lange gemessen, bis der hypoglykämische Komplex durch Synthalin in Gang gebracht wurde. Die erzielten Resultate sind in Tabelle III wiedergegeben.

Die Versuche beim Synthalin- und Insulintier mit hypoglykämischem Gepräge ergeben, dass die Restzuckerwerte der Organe und Gewebe ungefähr normal,—dabei die Werte der Lunge und des Gehirnes aber etwas herabgesetzt,—hingegen die Gesamtreduktions- und wahren Zuckerwerte stark vermindert sind. Die Leber des Synthalintieres stellt aber eine Besonderheit dar. Im Gegensatz zum Insulintier sind nämlich Gesamtreduktions- und wahrer Zuckerwerte in der Leber des Synthalintieres besonders stark herabgesetzt; viel stärker als in den übrigen Organen und Geweben. In dieser Beziehung verhalten sich die beiden Stoffe als ganz verschieden.

Was das Glykogen anbelangt, so nimmt dieser Stoff sowohl im Synthalin- wie auch im Insulintier sehr stark ab, am stärksten aber in der Leber und in dem Muskelgewebe. Es bestehen jedoch keine Unterschiede in der Intensität der Glykogenabnahme.

Zieht man diese Sonderstellung der Leber in Betracht, so wird sich der Gedanke ergeben, dass es sich wahrscheinlich um durch Synthalin bedingte Funktionsstörungen der Leber handle. Um diese Frage zu klären, haben wir an Kaninchen, die entweder gehungert hatten oder mit Phosphor bzw. Tetrachlorkohlenstoff

TABELLE III.

Datum	Körpergewicht der Kaninch. g.	Eingeführtes Synthalin mg.		Lunge mg %	Muskel mg %	Niere mg %	Leber mg %	Hirn mg %	Gesamtreduktions- wert des Blutes mg %				
									Vor	1 Std.	2 Std.	3 Std.	Krampf
Kontrolltier (Durchschnitt.) (7 Fälle)			G.-R.	423	463	414	1477	310					
			R.-R.	249	348	293	376	246					
			W.-Z.	174	115	121	1101	64					
			Glyk.	75	349	93	986	—					
20/X	2250	30	G.-R.	188	392	340	480	181	136	120	80	65	60
			R.-R.	180	350	310	390	150					
			W.-Z.	8	42	30	90	31					
1/XI	2360	30	G.-R.	173	392	324	335	186	114	175	107	—	61
			R.-R.	169	345	315	325	162					
			W.-Z.	4	47	9	10	24					
13/XI	2500	40	G.-R.	135	412	315	415	159	126	110	100	80	60
			R.-R.	130	371	300	384	140					
			W.-Z.	5	41	15	31	19					
25/XI	2300	30	G.-R.	155	430	350	450	160	116	171	108		63
			R.-R.	135	390	310	400	155					
			W.-Z.	20	40	40	50	5					
5/XII	1890	20	G.-R.	182	463	348	441	183	123	—	—	—	27
			R.-R.	176	411	310	370	171					
			W.-Z.	6	52	38	71	12					
			Glyk.	31	57	34	79						
19/XII	2300	30	G.-R.	188	392	350	490	181	126	—	—	—	60
			R.-R.	181	351	320	410	152					
			W.-Z.	7	41	30	80	29					
			Glyk.	30	55	30	70	—					

G.-R. = Gesamtreduktionswert
W.-Z. = Wahrer Zuckerwert

R.-R. = Restreduktionswert
Glyk. = Glykogen

TABELLE III. (continued)

Datum	Körper- gewicht des Kaninch. g.	Eingeführtes Insulin (klin. Eh.)		Lunge mg %	Muskel mg %	Niere mg %	Leber mg %	Hirn mg %	Gesamtreduktions- wert des Blutes mg %				Krampf
									Vor	1 Std.	2 Std.	3 Std.	
Kontrolltier (Durchschnitt.) (7 Fälle)			G.-R.	423	463	414	1477	310					
			R.-R.	249	348	193	376	246					
			W.-Z.	174	115	121	1101	64					
			Glyk.	75	349	93	986	—					
30/XII	1900	4.8	G.-R.	304	464	282	2276	254	124				28
			R.-R.	218	425	242	368	241					
			W.-Z.	86	39	40	1908	13					
			Glyk.	45	56	52	43	—					
2/III	1930	9.0	G.-R.	280		400	1631	270					
			R.-R.	190		355	480	240					
			W.-Z.	90		45	1151	30					
			Glyk.				300						
18/III	2280	9.5	G.-R.	320	335	360	1700	290	127	62	37		35
			R.-R.	280	310	340	510	270					
			W.-Z.	40	25	20	1190	20					
			Glyk.				234						
7/IV	2460	9.5	G.-R.	340	360	330	1430	380	116	64			32
			R.-R.	310	350	320	510	320					
			W.-Z.	30	10	10	920	60					
			Glyk.				161						
19/IV	2710	9	G.-R.	330	360	360	1495	292	119	81	64	53	31
			R.-R.	310	351	350	480	280					
			W.-Z.	20	9	10	1015	12					
			Glyk.				336						
25/IV	2280	9.5	G.-R.	320	335	360	2270	276	123				27
			R.-R.	230	295	314	705	262					
			W.-Z.	90	40	46	1522	14					
			Glyk.				42						

G.-R. = Gesamtreduktionswert

R.-R. = Restreduktionswert

W.-Z. = Wahrer Zuckerwert

Glyk. = Glykogen

vergiftet waren, die Zuckerbestimmungen unternommen, und zwar Bestimmungen der Gesamt- und Restreduktion sowie des wahren Zuckerwertes. Die Resultate gehen aus der Tabelle IV hervor.

Wie Tabelle IV angibt, findet man im Gehirn der Phosphor- bzw. Tetrachlorkohlenstofftiere keine, in den übrigen Organen und Geweben hingegen eine nicht unwesentliche Abnahme des Wahren-Zuckerwertes, die aber im Vergleich zum Synthalin- bzw. Insulintier nicht deutlich ist. Der Gesamtreduktionswert im Muskelgewebe bleibt dabei zwar unverändert, ist jedoch in sämtlichen Organen ziemlich erniedrigt. Was den Restreduktionswert anbelangt, so fällt die Abnahme ziemlich zugunsten des Gehirnes aus. In den übrigen Organen und Geweben ist dieser Wert jedoch fast normal.

Im Gegensatz zum Synthalin- bzw. Insulintier sowie dem leberfunktionsgestörten Tier ist der Restzucker im Hungertier überall stark vermindert. Ebenso auch ziemlich stark der Gesamtreduktions- und Wahre-Zuckerwert in den Organen und Geweben, aber dennoch weniger intensiv als beim Synthalin- bzw. Insulintier. Auch in den Organen und Geweben der leberfunktionsgestörten oder der hungernden Kaninchen kommt eine starke Abnahme des Glykogen bis zum Verschwinden zustande, so dass seine Bestimmung manchmal kaum möglich ist. Die Abnahme an Glykogen ist viel bedeutender als beim Synthalin- bzw. Insulintier.

Aus dem Ausfall der Versuche über die Kohlehydratverteilung in den Organen und Geweben der Synthalin-, Insulin- und Hungertiere sowie der leberfunktionsgestörten Tiere ist es gestattet zu schliessen, dass sich Synthalin und Insulin im Spiele des Kohlehydratstoffwechsels höchstwahrscheinlich ganz verschieden verhalten, und dass das Synthalintier in diesem Spiele dem leberfunktionsgestörten Tiere zwar nicht ganz gleich, jedoch mehr an dessen Seite zu stellen und von dem Hungertiere, in dem die Glykolyse enorm stark vor sich geht, deutlich zu unterscheiden ist.

Die Ursache der besonders interessanten Tatsache zu klären, dass sich einerseits beim Synthalintier eine hochgradige Abnahme an Zucker, vor allem an wahren Zucker in den Organen und Geweben und andererseits beim Insulintier eine leichte Zunahme des wahren Zuckers in der Leber findet, muss einer weiteren Unter-

TABELLE IV.

Datum	Körper- gewicht des Kaninchens g.			Lunge mg %	Muskel mg %	Niere mg %	Leber mg %	Hirn mg %
Kontrolltier			G.-R.	423	463	414	1477	310
			R.-R.	249	348	293	376	246
			W.-Z.	174	115	121	1101	64
			Glyk.	75	349	93	986	—
2/V	1940	1% Phosphor- Oliven-Öl 0.02 cem p. Kilo subcut. inj.	G.-R.	282	488	468	484	254
			R.-R.	240	450	403	350	150
			W.-Z.	42	38	57	134	104
			Glyk.	16	89	8	91	—
10/V	1970	1% Phosphor- Oliven-Öl 0.005 p. Kilo subcutan inj.	G.-R.	308	392	460	430	230
			R.-R.	268	348	403	280	130
			W.-Z.	40	44	57	150	100
			Glyk.	6	78	8	95	—
17/V	2000	1% Phosphor- Oliven-Öl 0.005 p. Kilo subcutan inj.	G.-R.	266	382	360	300	165
			R.-R.	221	338	310	160	71
			W.-Z.	45	44	50	140	94
			Glyk.	5	74	2	98	—
23/V	2000	Nekoirazu 0.02 g p. Kilo per os.	G.-R.	320	510	570	590	140
			R.-R.	270	460	500	437	70
			W.-Z.	50	50	70	153	70
			Glyk.	14	100	6	105	—
28/V	1900	„	G.-R.	310	491	300	553	140
			R.-R.	263	451	230	437	70
			W.-Z.	47	40	70	153	70
			Glyk.	12	96	5	104	—
2/VI	2700	Tetrachlor- kohlenstoff 0.5 cem p. Kilo per os	G.-R.	304	457	308	764	241
			R.-R.	240	400	254	351	150
			W.-Z.	64	54	54	413	91
			Glyk.	(—)	(—)	(—)	3	(—)
9/VI	2160	„	G.-R.	264	486	312	521	242
			R.-R.	208	412	259	364	158
			W.-Z.	56	74	53	157	84
			Glyk.	(—)	(—)	(—)	(—)	—

13/VI	1900	Hunger (8 Tage)	G.-R.	91	284	208	352	212
			R.-R.	54	210	84	200	157
			W.-Z.	37	74	124	152	55
			Glyk.	70	62	58	88	—
18/VI	2400	Hunger (10 Tage)	G.-R.	116	484	392	222	216
			R.-R.	85	431	276	149	161
			W.-Z.	31	53	53	73	55
			Glyk.	(—)	48	(—)	61	—
22/VI	2010	Hunger (12 Tage)	G.-R.	83	188	154	214	198
			R.-R.	51	178	90	148	149
			W.-Z.	32	10	64	66	49
			Glyk.	(—)	(—)	(—)	3	—
1/VII	1840	Hunger (10 Tage)	G.-R.	50	348	329	371	210
			R.-R.	19	287	276	303	164
			W.-Z.	31	61	53	68	46
			Glyk.	(—)	(—)	(—)	(—)	—

G.-R. = Gesamtreduktionswert

R.-R. = Restreduktionswert

W.-Z. = Wahrer Zuckerwert

Glyk. = Glykogen

suchung vorbehalten bleiben.

IV. ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Versuchsergebnisse über die Verteilung der Kohlehydrate in den Organen und Geweben des Synthalin- und Insulintieres weisen darauf hin, dass der Restzuckerwert fast gleich dem des normalen Tieres ist, während der Wahre-Zuckerwert und Glykogenspiegel eine deutliche Abnahme zeigen. Es hat sich herausgestellt, dass die Leber des Insulintieres im Gegensatz zum Synthalintier sich besonders verhält, indem der wahre Zucker und die Gesamtreduktion nicht nur nicht herabgesetzt, sondern eher etwas erhöht sind.

2. Mit der einzigen Ausnahme des Gehirnes zeigen die Organe und Gewebe der leberfunktionsgestörten Phosphor- bzw. Tetrachlorkohlenstofftiere einen dem normalen ganz nahen Restzuckerwert und eine ziemlich deutliche, jedoch im Vergleich zum Synthalin- bzw. Insulintier nicht sehr wesentliche Abnahme des Wahren-

Zuckerwertes. Die Abnahme an Glykogen ist aber viel stärker als beim Synthalin- bzw. Insulintier.

3. Die Kohlehydrate, und zwar namentlich die Gesamtreduktion, der Rest- und wahre Zucker in den Organen und Geweben der Hungertiere nehmen stets parallel ab. Am deutlichsten ist die Abnahme des Glykogen, so dass die Bestimmung desselben manchmal kaum möglich ist.

4. Aus dem Befund der Kohlehydratverteilung in den Organen und Geweben geht deutlich hervor, dass sich Synthalin-, Insulin- und Hungertiere im Spiele des Kohlehydratstoffwechsels ganz verschieden verhalten, und dass das Synthalintier in dieser Beziehung dem leberfunktionsgestörten Tier am nächsten steht, ihm jedoch nicht ganz gleichartig ist.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Dr. Takeda für seine stetige Anregung und Hilfe, den Herren Professoren Kakiuchi (Universität zu Tokyo), Akamatsu (Med. Akademie zu Chiba) für ihre freundlichen Ratschläge und Durchsicht der Arbeit zu danken.

LITERATUR.

- Ahlgren (1929): Biochem. Zeitschr., **206**.
 Arndt, Müller u. Schemann (1927): Klin. Wochenschr., Nr. 48.
 Barrenscheen u. Eisler (1927): Wien. Klin. Wochenschr., Nr. 34.
 Bödeker u. Junkersdorf (1928): Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., **129**.
 Frank, Nothmann u. Wagner (1926): Klin. Wochenschr., Nr. 45.
 Frank, Nothmann u. Wagner (1926): Deutsch. med. Wochenschr., Nr. 49-50.
 Hornnug u. Stanislaw (1928): Klin. Wochenschr., Nr. 2.
 Jansen u. Baur (1927): Muench. med. Wochenschr., Nr. 11.
 Karr, Belk and Petty (1929): Journ. of pharmacol., **36**.
 Karr, Walter, Petty and Schumann (1928): Journ. of biol. chem., **78**.
 Klein u. Weiss (1928): Endokrinologie, Bd. 1, H. 5.
 Morawitz u. Adler (1927): Klin. Wochenschr., Nr. 11.
 Ochiai (1930): Manshu Igaku Zasshi, Septemb.
 Ralli, Elaine and Tiber (1929): Journ. of pharmacol., **37**.
 Rodo, Marks (1928): Journ. of Physiol., **65**.
 Salén, Ernst u. Nyrén (1929): Berichte über die gesamte Physiol. u. Pharmakol., **47**.

Simola (1927): Zeitschr. f. physiol. Chem., **168**.

Staub (1928): Zeitschr. f. Klin. Med., **107**.

Takeda, Sugawara u. Tsunekawa (1929): Nippon Naika Gakkai
Zasshi, **17**.

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE VERSCHIEDENEN GLYKOLYTISCHEN KOFERMENTE.

VON

HARUO MATSUZAKI.

*Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut (Dircktor: Prof. Dr. K. Kodama)
und der I. Inneren Klinik (Direktor: Prof. Dr. R. Kaneko)
der Medizinischen Fakultät der Kaiserlichen Kyushu-
Universität zu Fukuoka, Japan.*

(Eingegangen am 27. März 1933.)

ÜBERSICHT.

Einleitung.

- I. Der Glukoseabbau durch verschiedene Gewebe.
- II. Der Abbau der Hexosephosphate durch verschiedene Gewebe.
- III. Die Einwirkung der verschiedenen Kofermente auf den Kohlenhydrat-
abbau des Tumor- und des Rotemuskelgewebes.
 1. Die Einwirkung des Koferments-T auf den Glukoseabbau des
Tumor- und des Rotemuskelgewebes.
 2. Die Einwirkung der Hexokinase auf den Glukoseabbau des
Tumor- und des Rotemuskelgewebes.
 3. Die Einwirkung des Nebennierenrinden-Extrakts auf den Kohlen-
hydratstoffwechsel des Tumor- und des Rotemuskelgewebes.
- IV. Die Verteilung der Phosphatase und der Phosphatase im Tumor und
im roten Muskel.
- V. Die Messung der Zuckeroxydations-Geschwindigkeit des Tumor- und
des Rotemuskelgewebes durch die Methylenblau-Methode.
- VI. Der Trioseabbau durch verschiedene Gewebe.
- VII. Zusammenfassung.
- VIII. Literatur.

EINLEITUNG.

Über den Kohlenhydratstoffwechsel im tierischen Organismus sind in den letzten Jahren viele Arbeiten veröffentlicht worden. Vor allem beim Zuckerabbau in den Muskeln fand Embden (1912) Lactacidogen, und seit seiner Arbeit, in der er die grosse Rolle der Phosphorsäure betonte, hat die Biochemie ganz allgemein ihre Aufmerksamkeit auf dieses Gebiet gelenkt. Wir wissen nun, dass

beim Glykogenabbau der Muskeln zunächst als Intermediärprodukt Hexosemonophosphat entsteht, und müssen annehmen, dass eine weitere Spaltung erfolgt; aber in anderen Organgeweben wird wahrscheinlich diese Spaltung nicht immer denselben Verlauf nehmen.

Bei Tierversuchen heilt bei Konvulsionen infolge Insulinhypoglykämie diese durch Glukose-Injektion sofort, während sie bei Injektion von Hexosephosphat nicht heilt. Das ist darauf zurückzuführen, dass die Glukose im Hirn leichter verbrannt wird als das Hexosephosphat, und so die Stoffwechselanomalieen infolge des Kohlenhydratmangels beseitigt werden. Lobel (1925) fand, dass die graue Hirnsubstanz Glukose gut, dagegen Glykogen und Hexosephosphat nicht spaltet. Ashford (1929) und auch Holmes beobachteten, dass der Glukoseabbau im Kaninchengehirn unabhängig von der Phosphorsäure vor sich geht. Warburg (1926) hat in seiner grossen Arbeit über den Stoffwechsel der Tumoren berichtet, dass das überlebende Tumorgewebe Glukose auffallend gut spaltet, dass dagegen die Spaltbarkeit des Hexosephosphats nur eine sehr geringe ist. Dahingegen fand Meyerhof (1926), dass die roten Muskeln und die Leber die Glukose nicht spalten, während das Hexosephosphat von ihnen gut gespalten wird.

Wenn wir diese Ergebnisse betrachten, dann leuchtet ein, dass ausser bei den roten Muskeln in dem Kohlenhydratstoffwechsel der anderen Organgewebe die Bildung von Hexosephosphatester als Stoffwechselzwischenprodukt nicht unbedingt nötig ist.

Verf. hat nun unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Kodama die Aufgabe übernommen, Forschungen über den Abbau verschiedener Kohlenhydrate in überlebenden Geweben und besonders über die Spezifität der Aktivatoren anzustellen, um dadurch einer Erklärung des Kohlenhydratstoffwechsels im lebenden Organismus näher zu kommen.

I. DER GLUKOSEABBAU DURCH VERSCHIEDENE GEWEBE.

1923 haben Warburg und seine Mitarbeiter eine Messungsmethode der Gewebsatmung und Glykolyse erfunden und mit Hilfe derselben dann eine ganze Reihe von bedeutenden Forschungen

durchgeführt. Besonders mit ihren biochemischen Forschungen über die Tumoren haben sie ein bis dahin noch völlig unbearbeitetes Gebiet in Angriff genommen. Seitdem wir nun diese bequeme und exakte Messungsmethode besitzen, haben alle biochemischen Forschungen eine ganz neue Richtung erhalten.

Auch ich habe mich zu meinen Untersuchungen der neuen Methode von Warburg (1926) bedient. Die Ringerlösung wurde nach dem Rezept von Y. Okamoto (1925) aus dem Warburg'schen Institut als eine dem Rattenserum isotonische Lösung (-0.56°C) dargestellt.

Um die Atmung, die aerobe und die anaerobe Glykolyse gleichzeitig messen zu können, hat Verf. die Manometer in der folgenden Weise angeordnet:

	I	II	III	Thermo- barometer
Ringer- Lösung	3 ccm	8 ccm	3 ccm	3 ccm
Gas	5% CO_2 95% O_2	5% CO_2 95% O_2	5% CO_2 95% N_2	5% CO_2 95% N_2
	Gewebe	Gewebe	Gewebe	Ohne Gewebe
Gefäß- konstante	$K_{\text{O}_2} = 1.1049$ $K_{\text{CO}_2} = 1.2651$	$K_{\text{O}_2} = 0.7520$ $K_{\text{CO}_2} = 1.1819$	$K_{\text{CO}_2} = 1.4742$	

Das Gas wurde in der Form genommen, wie es das hiesige Gaswerk liefert und zur Messung der anaeroben Glykolyse die Spur von Sauerstoff im N_2 - CO_2 -Gasgemisch durch Überleiten über erhitztes reduziertes Kupfer beseitigt. Das Gas wurde zunächst in Ringer-Lösung bis zur Sättigung durchgeleitet und dann der Luftraum der Kästchen mit dem Manometer damit gefüllt. Die pH der mit Gas gesättigten Ringer-Lösung war, mit dem Indikator gemessen, 7.3–7.7. Die Versuche wurden im Thermostat bei 37.5°C ausgeführt.

Als Versuchsmaterial diente der Typus IV des Mäusekrebses und das Kaninchen-Spindelzellensarkom aus dem Pathologischen

Institut unserer Fakultät. Diese wurden subcutan auf das betreffende Tier transplantiert, und dann wurde nach ca. 3–4 Wochen der mässig entwickelte Tumor direkt vor dem Versuche aseptisch exstirpiert und mit dem Rasiermesser in Schnitte zerlegt; die makroskopisch sichtbaren nekrotisierten Teile wurden entfernt, und dann immer etwa gleich grosse Stückchen zum Versuche gebraucht. Als rote Muskeln wurden solche vom Oberschenkel von Kaninchen aseptisch entnommen, und davon Schnitte hergestellt. Die Leber wurde von gut ernährten Mäusen nach Abtötung direkt vor dem Versuche aseptisch exstirpiert, und dann in Schnitte zerlegt.

Die Gewebe wurden im Trockenschrank ca. 2 Stunden lang, jedenfalls bis zur Gewichtskonstanz, getrocknet. Das Trockengewicht wurde mit der Mikrowage von Sartorius festgestellt und dann zu den Berechnungen verwertet.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen stimmen in jeglicher Beziehung mit denen von Warburg überein. In der Tabelle I wurden nur die Mittelwerte der mehrmaligen Bestimmungen an einzelnen Organen veröffentlicht, wobei Q^{O_2} , $Q_M^{O_2}$ und $Q_M^{N_2}$ die gewöhnliche Bedeutung zugeschrieben ist.

TABELLE I.

Glukose-Abbau durch verschiedene Gewebe.

37.5° Pœ = 7.5

Ringer-Lösung. $NaHCO_3 = 2,5 \cdot 10^{-2}$ Mol.Glukose = $1,1 \cdot 10^{-2}$ Mol.

Gewebe	Q^{O_2}	$Q_M^{O_2}$	$Q_M^{N_2}$
Krebs	— 5.24	3.27	23.10
Sarkom	— 5.17	11.27	21.64
Zwerchfell	— 3.37	0.74	1.89
Hirngewebe	— 11.46	7.49	10.27
Leber	— 9.75	0	2.30
Roter Muskel	— 1.66	1.07	0.93

In der Tabelle II sind die Ergebnisse der analogen Untersuchungen mit Lävulose wiedergegeben.

Aus den Tabellen ergibt sich, dass im Vergleich zu der recht guten Spaltung der Glukose durch das Tumorgewebe, die Lävulose

TABELLE II.

Lävulose-Abbau durch verschiedene Gewebe.

37.5° PH = 7.5

Ringer-Lösung. $\text{NaHCO}_3 = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ Mol.}$

Lävulose = $1,1 \cdot 10^{-2} \text{ Mol.}$

Gewebe	Q^{O_2}	Q^{O_2}	$Q_M^{N_2}$
Krebs-	-6.40	0	1.83
Sarkom	-3.94	0	1.06
Leber	-9.03	2.71	12.09

losespaltung durch dasselbe nur gering ist. Bei der Leber ist dahingegen die Lävulosespaltung höher als die der Glukose.

II. DER ABBAU DER HEXOSEPHOSPHATE DURCH VERSCHIEDENE GEWEBE.

Die Versuchsmethodik und das angewandte Material waren ganz dieselben wie in dem vorhergehenden Versuche.

Als Hexosephosphate-Präparate wurden das Candiolin (Hexosediphosphorsäures Calcium-Bayer) und das Yatoconin-Funaoka gebraucht. Das Candiolin ist in Wasser schwer löslich; ich habe es deshalb mit 0.1 ccm $N/10$ HCl mechanisch zerrieben und so gelöst. Sodann wurde das Calcium durch Zusatz einer entsprechenden Menge Natriumoxalat beseitigt.

Das Yatoconin, ein käufliches Präparat von Fructosemonophosphatecalcium, wurde frisch aus der Ampulle mit Ringerlösung vermischt, und das Calcium ebenso wie beim vorigen Präparate beseitigt. Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle III angegeben. (Nur Mittelwerte angegeben).

Der Hexosephosphatabbau des Tumorgewebes ist im Vergleich zum Glukoseabbau desselben nur sehr gering, dagegen ist die Hexosephosphat-Abbaugeschwindigkeit bei den roten Muskeln und der Leber bedeutend grösser als die für die Glukose.

Fassen wir die erhaltenen Resultate zusammen, so ergibt sich, dass die quergestreiften roten Muskeln und die Leber das Hexosephosphat besser spalten als die Glukose, dagegen diese von Sarkom, Karzinom, Gehirngewebe und Zwerchfell auffallend besser gespalten

TABELLE III.

Hexosephosphate (Candiolin und Yatoconin)-Abbau durch verschiedene Gewebe.

37.5° PH = 7.5

Ringer-L^{*}sung. NaHCO₃ = 2,5.10⁻² Mol.Candiolin = 0,2proz. Yatoconin = 1,1.10⁻² Mol.

Gewebe	Q ^{O₂}	Q ^{O₂} _M	Q ^{N₂} _M
Krebs	- 6.23	0	2.87
Sarkom			
Candiolin	- 3.32	0.1	2.79
Yatoconin	- 5.35	0	1.22
Zwerchfell	- 6.14	0.96	0.56
Hirngewebe	- 1.15	1.19	1.52
Roter Muskel			
Candiolin	- 3.13	2.77	4.35
Yatoconin	- 1.52	1.38	3.11
Leber	-18.58	0	3.74

wird, als das Hexosephosphat. Es lassen sich also, wie das schon von Bumm (1930) vorgeschlagen worden ist, je nach ihrer Spaltungsfähigkeit für Kohlehydrate 2 verschiedene Systeme von Geweben unterscheiden, d.h. ein die Glukose spaltendes Tumorsystem und ein das Hexosephosphat spaltendes Rotemuskelsystem.

Die vom lebenden Organismus resorbierten Kohlenhydrate werden als Reservestoff in Form von Glykogen in der Leber abgelagert, werden dann durch nervöse oder chemische Reize in Glukose umgewandelt und treten als solche in die Blutbahn ein. Ein Teil der Kohlenhydrate wird als Glykogen in den Muskeln aufgespeichert und bildet hier die Energiequelle für die Muskelkontraktionen.

Embden (1926) hat bereits gefunden, dass bei dem Glykogen- und Glukoseabbau durch die Muskeln Hexosephosphat als Intermediärprodukt gebildet wird. Aus meinen eigenen Versuchen geht ja auch klar hervor, dass die Hexosephosphate, Candiolin und Yatoconin, durch die Muskeln schneller gespalten werden als die Glukose. Bezüglich des Glykogenabbaus durch die Leber haben wir die Arbeiten von Riesser (1924) und von Barrenscheen (1930), die fanden, dass bei der Leber ebenso wie bei den Muskeln Hexosephosphat als Zwischenprodukt gebildet wird. Auch bei

meinen Versuchen habe ich festgestellt, dass die Hexosephosphat-spaltung etwas umfangreicher ist als die der Glukose. Hier ist ganz besonders interessant, dass die Spaltungsgeschwindigkeit der Tumorgewebe für Glukose eine bedeutend grössere ist als für das Hexosephosphat. Wenn aber das Tumorgewebe ebenso wie die Muskeln beim Abbau von Glykogen und Glukose das Hexosephosphat als Zwischenprodukt bilden würde, dann wären meine bisherigen Ergebnisse einander widersprechend. Um nun den Spaltungsverlauf bei Tumoren noch klarer zu machen, habe ich die nachstehenden Versuche angestellt.

III. DIE EINWIRKUNG DER VERSCHIEDENEN KOFERMENTE AUF DEN KOHLENHYDRATABBAU DES TUMOR- UND ROTEMUSKEL-GEWEBES.

Die tierische wie die pflanzliche Zelle braucht zum Kohlenhydratabbau die Wirkung eines Ferments, der Zymase. Euler hat aber gefunden, dass ausser dieser immer noch das Vorhandensein einer Kozymase notwendig ist. Und mit den neuesten Fortschritten der Forschung ist die Frage der Bedeutung der Kozymase für den Kohlenhydratstoffwechsel ausserordentlich verwickelt geworden.

Harden und Young (1906) haben in dem Hefekochsaft eine die Gärung befördernde Substanz gefunden und diese als Kozymase bezeichnet. Meyerhof (1921) fand dann, dass bei der chemischen Reaktion, durch die die Muskeln das Glykogen spalten und dann das als Zwischenprodukt entstandene Hexosephosphat weiter in Milchsäure umsetzen, ein Koferment eine wichtige Rolle spiele; und er behauptete weiter, dass dieses Koferment und die Kozymase der Hefe einander ersetzen könnten, wie denn auch ihre chemische Zusammensetzung dieselbe sei. Lohmann (1931) hat dann aus den Muskeln Adenylpyrophosphorsäure isoliert und diese für den wirksamen Bestandteil des Koferments erklärt, der ebenso wie dieses auch dieselbe Wirkung wie die Kozymase entfalte. Er fand weiter, dass zur Entfaltung der Wirksamkeit des von ihm gefundenen Stoffes das Vorhandensein des Mg-Ions von Wichtigkeit sei. Euler und Myrbäck (1931) haben aus der Hefe eine stark aktive Kozymase dargestellt und die Aktivität derselben mit

der Adenylpyrophosphorsäure von Lohmann verglichen. Auf Grund ihrer Ergebnisse haben sie zwar gegen einen Teil der Schlussfolgerungen Lohmann's Einwände erhoben, doch stimmen sie mit letzterem Forscher insofern überein, als auch sie eine Adenylsäureverbindung für die Wirkung der Kozymase verantwortlich machen. Bezüglich der Wirkungsweise des Koferments sind sich die genannten Autoren darüber einig, dass es die Aufgabe habe, die Phosphorylierung, die den ersten Angriff bei dem Kohlenhydratabbau ausführt, zu aktivieren, d.h. dass es für den Kohlenhydratstoffwechsel der roten Muskeln unentbehrlich ist. Welche Bedeutung aber das Koferment für den Kohlenhydratabbau der Tumoren hat, ist bisher leider noch nicht experimentell festgestellt worden.

1. Die Einwirkung des Koferments-T auf den Glukose-Abbau des Tumorgewebes und der roten Muskeln.

1924 hat Watermann mittels eines Extrakts von Krebsgewebe die Glykolyse der isolierten Niere gesteigert und diese Wirkung als der des Meyerhof'schen Koferments(1921) identisch erklärt. Euler und Myrbäck (1925) haben durch Hefegärungsversuche festgestellt, dass in dem Karzinom die Kozymase der Alkoholgärung reichlich vorhanden ist. Kraut und Bumm(1929) haben unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Glukosespaltung beim Karzinom eine sehr grosse ist, ein Karzinomextrakt hergestellt, mit Hilfe dessen es ihnen gelang, den Glukoseabbau des Nierengewebes zu aktivieren. Späteren Forschungen zufolge aber ist die Wirkungsweise des Koferments-T und der Kozymase sowie des Koferments eine verschiedene; das erstere hat auf die Zuckerspaltung der Hefe oder des Rotemuskel-Systems, d.h. bei der Phosphorylierung mit dem Ziele des Glukoseabbaus, keinen Einfluss. Dagegen soll das Koferment-T beim Karzinom, den Nieren, den weissen Muskeln (Zwerchfell usw.), dem Gehirn u. a. m. die einen anderen Verlauf nehmende Glukosespaltung aktivieren.

Verf. hat aus dem Kaninchensarkom ein Extrakt hergestellt und die Wirkung desselben auf die Glukosespaltung der verschiedenen Gewebe beobachtet.

Methodik und Versuchsmaterial.

Zur Durchführung der Versuche diente auch hier das Warburg'sche Manometer und ein anaerobes Medium. Kontrolle und Versuch wurden gleichzeitig durchgeführt. Als Materialien dienten wie in den vorhergehenden Versuchen Sarkom, Leber und Muskeln. Das Zwerchfell wurde nach Abtöten von Mäusen und Abpräparieren desselben in dem so erhaltenen Zustand gebraucht. Von den nach der Tötung der Kaninchen durch Luftembolie erhaltenen Nieren wurden Schnittpräparate hergestellt und angewendet.

Die Darstellung des gereinigten Tumorextraktes aus dem Kaninchensarkom wurde ebenso vorgenommen, wie Kraut und Bumm (1928) sie beim Rattensarkom von Jensen vorgenommen haben. Der Tumor wurde exstirpiert, makroskopisch von nekrotischen Teilen befreit und dann in kleine Stückchen zerschnitten, die dann zwei Stunden lang in der vierfachen Menge Aceton stehen gelassen wurden. Darauf wurden sie wieder 1 Stunde lang in der gleichen Menge Aceton, dann in einer Aceton-Äther-Mischung 30 Minuten und schliesslich in Äther 30 Minuten stehen gelassen und dann im Exsikkator getrocknet. Danach wurden 2 g des gelblichbraunen Trockenpräparates in einem Mörser zu Pulver zerrieben und unter Zusatz von 50 cem $N/100$ NH_3 unter weiterem Reiben 2 Stunden lang extrahiert. Dann wurde zentrifugiert, der überstehenden Flüssigkeit die 8 fache Menge von 96%igem Alkohol zugesetzt und ungefähr zwei Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, worauf sich ein weisser, flockiger Niederschlag abschied, der dann abzentrifugiert, nach Ätherzusatz getrocknet und im Exsikkator aufbewahrt wurde. Bei der erhaltenen Substanz handelt es sich um das Koferment-T. Die Resultate sind in Tabelle IV zusammengebracht.

Wie aus der Tabelle IV ersichtlich ist, wurde der Glukoseabbau der Nieren und des Zwerchfells um rund das Doppelte aktiviert. Im Vergleich hierzu ist die Aktivierung des Glukoseabbaus durch das Sarkom nur gering. Die Ursache für diese Erscheinung dürfte darin zu suchen sein, dass das Sarkom schon an sich sehr grosse

Mengen von den Koferment-T enthält, und daher der glykolytische Apparat schon sowieso ad maximum arbeitet, sodass ein weiterer Zusatz des Koferments-T wirkungslos bleibt.

TABELLE IV.

Der Einfluss des Koferments-T auf den anaeroben Glukose-Abbau.

37.5° PH = 7.5

Ringer-Lösung. $\text{NaHCO}_3 = 2.5 \cdot 10^{-2} \text{ Mol.}$

Glukose = $1.1 \cdot 10^{-2} \text{ Mol.}$

Gewebe	Versuchs-Nr.	Koferment T.	Kontrolle	Versuch	Zunahme %
Sarkom	1	0.013 g	26.94	34.93	29.6
	2	„	24.91	28.15	13.0
	3	„	23.83	31.14	30.6
	Mittel		25.93	30.82	24.4
	Ohne Glukose	0.015	1.46	2.75	
Zwerchfell	1	0.013	1.67	3.25	94.6
	2	„	2.00	3.65	82.5
	3	0.015	2.78	9.04	225.1
	Mittel		2.15	5.31	100.7
	Ohne Glukose	0.015	0.64	0.54	
Niere	1	0.007	4.10	7.57	84.6
	2	0.013	3.03	5.51	81.8
	3	0.017	2.90	6.53	125.1
	Mittel		3.34	6.53	97.1
	Ohne Glukose	0.015	1.73	1.27	
Leber	1	0.007	1.78	2.10	18.0
	2	0.010	1.14	1.17	2.7
	3	0.013	1.16	1.30	12.0
	Mittel		1.36	1.52	10.2
Muskel	1	0.013	2.02	1.59	(—)
	2	0.015	1.85	2.07	11.0
	Mittel		1.93	1.83	(—)

Im allgemeinen ist aus den Versuchen zu schliessen, dass das Koferment-T auf das Sarkom, das Zwerchfell und die Nieren einen deutlich die Glukose-Spaltung aktivierenden Einfluss hat, während dies bei den roten Muskeln und der Leber nicht der Fall ist. Die

geringe Aktivierung im Falle der Leber, wie sie aus der Tabelle hervorgeht, übersteigt nicht die Grenzen der Möglichkeit eines technischen Fehlers. Bei den roten Muskeln und der Leber wirkt die Kozymase bei der Phosphorylierung der Hexosephosphatester im Prozesse des Abbaus der Glukose und des Glykogens; das Koferment-T hat daran bei diesen Geweben keinen Anteil, wohl aber beim Tumorgewebe. Aus diesen Ergebnissen meiner Versuche ist ersichtlich, dass Kozymase und Koferment-T ganz verschiedene Dinge sind, und dass das Koferment-T an der Phosphorylierung keinerlei Anteil hat.

2. Die Einwirkung der Hexokinase auf den Glukoseabbau des Tumor- und Rotemuskelgewebes.

Meyerhof (1927) hat aus einem Extrakt von Bäckerhefe einen Aktivator isoliert, den er Hexokinase nannte. Mit Hilfe dieser Hexokinase gelang es ihm den Glukoseabbau im Muskel-extrakt zu aktivieren. Seiner Ansicht nach besteht die Wirkung der Hexokinase in einer Aktivierung der Veresterung der Glukose und der Phosphorsäure, bei der die gebildete Hexosephosphorsäure auf dem Wege über ein ähnliches Zwischenprodukt wie bei der Glykogen gespalten wird. Euler (1928) hat durch Zusatz von Hexokinase zu trockenen Muskeln ebenfalls eine Aktivierung von deren Glukoseabbau beobachtet. Kraut und Bumm (1928) haben die Wirkung der Hexokinase und des Koferments-T miteinander verglichen und dabei gefunden, dass der Glukoseabbau der roten Muskeln durch die Hexokinase aktiviert wird, während das Koferment-T keinerlei Einfluss zeigte.

Verf. hat den Einfluss der Hexokinase auf den Glukoseabbau durch die roten Muskeln und das Tumorgewebe untersucht, um festzustellen, ob der Verlauf der Glukosespaltung bei den roten Muskeln und dem Tumorgewebe derselbe sei.

Die Methodik war dieselbe wie bei den vorhergehenden Versuchen, ebenso auch das Material.

Die Hexokinase wurde wie folgt nach Meyerhof aus Bäckerhefe dargestellt: 200 g Bäckerhefe wurden mit einer kleinen Menge Toluol verrieben, bei 35°C 45 Minuten lang im Brutschrank

plasmolysiert, darauf das gleiche Volum destilliertes Wasser hinzugesetzt, verrieben, 2 Stunden lang im Brutschrank bei 35°C stehen gelassen, zentrifugiert, dem Rückstand wieder etwas Toluol zugesetzt, verrührt und dann über Nacht im Brutschrank bei 35°C stehen gelassen. Am anderen Morgen wurde dann wieder zentrifugiert, die erhaltene zitronengelbe überstehende Flüssigkeit auf 0°C abgekühlt, die gleiche Menge absoluten Alkohols hinzugesetzt, wieder abgekühlt und der erhaltene weisse, flockige Niederschlag zentrifugiert. Um diesen im Warburg'schen Apparat verwenden zu können, wurden die flüchtigen Substanzen, wie Alkohol und Toluol, im Vakuum abgedampft, und so eine bräunlichgrüne Substanz erhalten, und zwar in einer Ausbeute von 15 g. Diese wurde dann wieder unter Zusatz von 20 ccm destilliertem Wasser im Mörser zerrieben, und die überstehende Flüssigkeit in der Eiskammer aufbewahrt. Die Resultate sind in Tabelle V angegeben.

TABELLE V.

Der Einfluss der Hexokinase auf den anaeroben Glukose-Abbau.

37.5° PH=7.5

Ringer-Lösung. $\text{NaHCO}_3 = 2,5 \cdot 10^{-2}$ Mol.Glukose = $1,1 \cdot 10^{-2}$ Mol.

Gewebe	Versuchs- Nummer	Hexokinase	Kontrolle	Versuch	Zunahme %
Roter Muskel	1	0.05 ccm	0.66	2.10	219
	2	„	0.52	3.22	519
	3	„	0.72	1.66	130
	4	„	0.29	3.21	1007
	Mittel		0.55	2.55	364
	Ohne Glukose	0.05	0.81	0.51	
Sarkom	1	0.05	24.68	24.13	(—)
	2	„	20.11	21.74	8.0
	3	„	21.83	19.54	(—)
	Mittel		22.31	21.80	(—)

Aus den Ergebnissen der dann mit dem Warburg'schen Manometer vorgenommenen Untersuchungen ist zu ersehen, dass die Glukose durch das Rotemuskelgewebe so gut wie nicht gespalten

wird, dass durch Zusatz von Hexokinase aber eine deutliche Aktivierung eintritt. Dagegen hat die Hexokinase auf die Glukosespaltung des Tumorgewebes keinerlei Einfluss. Demnach ist also anzunehmen, dass anders als bei der Glukosespaltung durch das Rotemuskelgewebe, das Carcinomgewebe bei der Glukosespaltung kein Hexosephosphat als Zwischenstufe bildet.

3. *Die Einwirkung des Nebennierenrinden-Extrakts auf den Kohlenhydratstoffwechsel des Tumor- und des Rotemuskelgewebes.*

Tiere, denen die Nebennieren exstirpiert werden, gehen nach wenigen Tagen ein, woraus sich ergibt, dass dieses Organ für die Tiere eine lebenswichtige Rolle spielt. Tsukano (1932) hat in unserem Institut mit Hilfe von Thunberg's Methylenblaumethode festgestellt, dass der Nebennierenrinden-Extrakt ein für die Oxydation des Biozuckers (Kodama's Hexosemonophosphorsäure) wichtiges Koferment enthält. Tokumitsu (1917) fand weiter, dass bei Unterbindung des Ductus pancreaticus Hypertrophie der Nebennierenrinde entsteht, und dass bei Exstirpation der Nebennierenrinde Glykosurie auftritt. Nagai (1932) stellte dann fest, dass bei Avitaminose die Oxydationskraft des Herzmuskels und der roten Muskeln abnimmt, während andererseits Hypertrophie und Vermehrung des Kozymasegehaltes der Nebennierenrinde stattfindet. In der letzten Zeit hat nun noch St. Gyorgi (1928) gefunden, dass die Nebennierenrinde einen kräftigen Oxydationskatalysator enthält.

Aus allen diesen Untersuchungsergebnissen geht deutlich hervor, dass die Nebennierenrinde für den Kohlenhydratstoffwechsel von der grössten Bedeutung ist.

Verf. hat Untersuchungen über den Einfluss des Nebennierenrinden-Extrakts auf das Rotemuskel-Candiolin-System und das Tumor-Glukose-System angestellt. Die Untersuchungsmethodik und das Material waren dieselben wie in den vorhergehenden Versuchen.

Darstellung des Nebennierenrinden-Extrakts.

Von frischer Ochsennebenniere wurde die Rinde abpräpariert,

zerkleinert, dazu das gleiche Volumen destilliertes Wasser hinzugesetzt, auf dem Wasserbad ca. 30 Minuten lang gekocht, durch entfettete Watte filtriert, dem Filtrat das halbe Volumen Chloroform zugesetzt, geschüttelt und dann bei Zimmertemperatur mittels der Wasserstrahlpumpe das Chloroform abgedampft. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Sodann wurde 25% ige Trichloressigsäure zugesetzt, bis dass die Endkonzentration 5% betrug; die Lösung wurde durch ein aschefreies Filter filtriert, das Filtrat mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ auf eine pH von 6.8 neutralisiert, dann wieder filtriert und dem Filtrat absoluter Alkohol zugesetzt, bis dass die Endkonzentration 90% betrug. Hierbei entstand ein weisser flockiger Niederschlag, der abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und im Vakuum eingetrocknet wurde. Es wurde dabei eine leicht grünliche Substanz erhalten, die im Exsikkator aufbewahrt wurde.

Die Ergebnisse sind in Tabelle VI angegeben.

TABELLE VI.

Der Einfluss des Nebennierenrinden-Extrakts auf den Candiolin-Abbau der roten Muskulatur und den Glukose-Abbau des Sarkoms
(nur Mittelwerte angegeben)

$\text{pH} = 7.5$ Ringer-Lösung, $\text{NaHCO}_3 = 2.5 \cdot 10^{-2}$ Mol.

Candiolin = 0,2 Proz.

Glukose = $1.1 \cdot 10^{-2}$ Mol. Extrakt = 0,02 g in 24.8 ccm.

Gewebe	Q^{O_2}	$\text{Q}_M^{\text{O}_2}$	$\text{Q}_M^{\text{N}_2}$	Zunahme d. $\text{Q}_M^{\text{N}_2}$ %
Nicht gewaschener Muskel				
Ohne Extr.	-3.13	2.77	4.35	
Mit Extr.	-7.97	5.95	7.04	84
Gewaschener Muskel				
Ohne Extr.	-1.62	1.45	2.34	
Mit Extr.	-5.79	2.94	4.76	103
Muskel + Extr.	-2.43	0.51	0.74	
Muskel allein.	-1.84	0.94	1.04	
Sarkom mit Extr.	-5.17	11.27	21.64	
Ohne Extr.	-7.48	9.74	23.47	

Aus den Versuchen geht deutlich hervor, dass der Nebennierenrinden-Extrakt auf den Candiolinabbau durch die roten

Muskeln aktivierend wirkt. Der Einfluss des Nebennierenrinden-Extrakts auf den Glukose-Abbau durch das Sarkomgewebe aber geht, wenn er auch gegenüber der Kontrolle vorhanden zu sein scheint, doch nicht über den Maximalwert bei der Kontrolle hinaus. Der Nebennierenrinden-Extrakt hat also anders als das Koferment-T zwar einen Einfluss als Aktivator auf den Candiolinabbau der roten Muskeln, dagegen nicht auf den Glukoseabbau des Tumorgewebes.

Wir wissen aus den bisherigen Versuchen, dass das Hexosephosphat durch Glykolyse von den roten Muskeln gut gespalten wird, bei welchem glykolytischen Vorgang ausser den Fermenten des Muskelgewebes auch Kofermente eine grosse Bedeutung haben. Um nun festzustellen, welche Beziehungen zwischen Koferment und Nebennierenrinden-Extrakt bestehen, habe ich bei den Versuchen die roten Muskeln mit Ringerlösung gewaschen und gefunden, dass durch die teilweise Entfernung des Koferments die Glykolyse auffallend herabgesetzt wurde. Fügte ich dann Nebennierenrinden-Extrakt hinzu, so wurde die glykolytische Kraft wiederhergestellt, und selbstverständlich wurde auch die Glykolyse bei den nicht gewaschenen Muskeln durch Zusatz des Extraktes aktiviert. Daraus lässt sich annehmen, dass Extrakt eine Substanz enthält, die das Koferment des Muskels zu ersetzen vermag. Diese Substanz aktiviert den Kohlenhydratabbau der roten Muskeln, bei dem als Zwischenstufe Hexosephosphat gebildet wird, in auffallender und zwar der gleichen Weise wie das Koferment, wogegen es auf den Glukoseabbau des Tumorgewebes so gut wie keinerlei Einfluss hat, woraus wiederum gefolgert werden kann, dass der Abbau der Kohlenhydrate bei dem Tumorgewebe über eine andere Zwischenstufe gehen muss.

Die oben aufgefundenen grossen Unterschiede zwischen Tumoren und dem Rotemuskelgewebe in ihrem Verhalten beim Kohlenhydratstoffwechsel lenkt die besondere Aufmerksamkeit auf die Rolle der Phosphatase und der Phosphatase in den betreffenden Geweben. Man kann wohl annehmen, dass der schlechte Abbau von Hexosephosphaten durch das Tumorgewebe dem Fehlen an Phosphatase, einem die Phosphorsäure abspaltenden Ferment.

zuzuschreiben ist, während im Muskel solche reichlich vorhanden ist, und hier die Hexose im aktiven Zustand abgespalten werden kann. Aber im Muskelgewebe kann die Phosphatase, ein synthetisches Ferment der Hexosephosphate fehlen, infolgedessen dann die Glukose nicht abgebaut werden kann.

IV. DIE VERTEILUNG DER PHOSPHATESE UND DER PHOSPHATASE IM TUMOR UND ROTEMUSKELGEWEBE.

Verf. hat nun in weiteren Versuchen die Verteilung der beiden Fermente bei dem Zuckerabbau der in Frage stehenden beiden Gewebssysteme gemessen, um möglicherweise den Verlauf des Zuckerabbaus noch klarer zu machen, wodurch auch die wesentliche Rolle der Fermente in Kohlenhydratmetabolismus erhellt werden könnte.

Zu diesen Versuchen bediente ich mich der Methode von Fiske und Subbarow (1925), d. h. es wurde durch Zusatz von Ammoniummolybdat-Reagens I zu Phosphorsäure Phosphormolybdänsäure hergestellt, diese durch Amino-naphtol-sulfonsäure reduziert und kolorimetrisch mittels Molybdänblau das P_2O_5 bestimmt. Als Material diente das Kaninchensarkom, von dem nach der Exstirpation das Blut sorgfältig abgewischt und die nekrotisierten Teile beseitigt wurden. Von ihm wurde dann ein Brei hergestellt. Als Rotemuskelgewebe diente ein Brei der Oberschenkelmuskeln von gut entbluteten Kaninchen.

1. *Phosphatase-Bestimmung.*

Zu 1 g des Gewebsbreis wurden 4 ccm Glykokoll-Puffer (PH 8.6), 1 ccm 1%iges Candiolin, oder 1 ccm M/20 Glycerophosphat und 0.2 ccm Toluol hinzugegeben; das Ganze wurde gut durchgemischt. Ein Teil dieses Gemisches diente zur Bestimmung der bereits frei vorhandenen anorganischen Phosphorsäure. Diesem Teil wurden sofort 5 ccm 10%ige Trichloressigsäure hinzugefügt, es wurde enteint, filtriert und dann im Filtrat die anorganische Phosphorsäure bestimmt. Der andere Teil diente zur Bestimmung der durch die Phosphatase gespaltenen Phosphorsäure. Er wurde zunächst bei 37°C 24 Stunden lang im Brutschrank stehen gelassen

und dann nach der oben erwähnten Methode enteieisst. Zu 1 ccm des Filtrats wurden 3 ccm Molybdat-Reagen I, und 1 ccm gereinigte Eikonogenlösung hinzugesetzt und dann wurde mit dest. Wasser auf 25 ccm aufgefüllt. Alsdann wurden weiter zu 1 ccm einer Standard-Phosphorsäure-Lösung (entsprechend 0.1 mg Phosphor) 3 ccm des Molybdat-Reagens I, 0.5 ccm 10%ige Trichloressigsäure, 1 ccm Eikonogenlösung zugesetzt, und auch hier wurde auf 25 ccm mit dest. Wasser aufgefüllt. Beide Lösungen wurden dann während 5 Minuten bei 37°C im Thermostaten gehalten; nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wurde dann die kolorimetrische Bestimmung vorgenommen. Der Unterschied in dem Gehalt an freier Phosphorsäure sofort nach Herstellung des 1. Teils des Gemisches und dem des 2. Teils, der 24 Stunden im Brutschrank gestanden hatte, wurde als Phosphatase ausgerechnet. Die Resultate sind in Tabelle VII angegeben.

2. *Phosphatase-Bestimmung.*

Das Gewebsmaterial war dasselbe wie bei der Phosphatase-Bestimmung. Zu 1 g des Gewebsbreis wurden 1 ccm 2%igen NaF, 1 ccm 1%igen Na_2HPO_4 , 1 ccm 1.5%iges Glykogen und 0.2 ccm Toluol zugesetzt. Der eine Teil dieser Lösung wurde mit 7%iger Trichloressigsäure enteieisst, und in dem Filtrat die anorganische Phosphorsäure bestimmt. Der andere Teil wurde 24 Stunden lang bei 37°C im Brutschrank gehalten, enteieisst, und in dem Filtrat die freie Phosphorsäure bestimmt. Aus der Differenz zwischen dem Phosphorsäuregehalt der beiden Lösungen wurde die Phosphatase-Menge berechnet. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle VII zusammengestellt.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass im Rotemuskelgewebe Phosphatase ebenso wie Phosphatase in grossen Mengen vorhanden ist, und dass die Esterbildung und -spaltung sehr lebhaft vor sich gehen. In dem Tumorgewebe ist fast gar keine Phosphatase vorhanden, daher fast gar keine Esterbildung stattfindet. Dagegen ist in dem Tumorgewebe eine grössere Menge Phosphatase enthalten als in dem Muskelgewebe. Demnach ist die Vermutung, dass dem Tumorgewebe wegen Mangels an Phos-

TABELLE VII.

Phosphatase und Phosphatase des Sarkoms und der roten Muskulatur.
(Anorg. Phosphat in mg synthetisiert od. gespaltet in 24 Std. bei 37°C).

Sarkom		Rote Muskulatur	
Phosphatase			
	0.113		0.834
	0.113		0.983
	0.062		0.834
	0.046		1.032
	0.068		1.032
Mittel	0.080	Mittel	0.943
Phosphatase			
Candiolin	Glycerophosphat	Candiolin	Glycerophosphat
1.251	1.279	0.878	1.018
1.233	1.201	0.889	0.965
1.233	1.274	0.924	1.070
Mittel 1.239	1.261	Mittel 0.897	1.040
	1.227		0.992
	Mittel 1.250		Mittel 1.017

phatase die Fähigkeit des Hexosephosphat-Abbaus abgeht, nicht aufrecht zu erhalten. Es scheint eher annehmbar, dass die Phosphorsäuren keine bemerkenswerte Rolle im Kohlenhydratmetabolismus der Tumoren spielen.

V. DAS WASSERSTOFFAKTIVIERUNGS-VERMÖGEN DES TUMOR- UND DES ROTEMUSKELGEWEBES VERGlichen MIT HILFE DER METHYLENBLAU-METHODE.

Die Tumor- und Muskelsysteme können verschiedene Formen von Zucker zum Abbau bringen; und es ist wohl bekannt, dass als Abbau-Endprodukte gemeinschaftlich Milchsäure geliefert wird; jedoch haben wir über die Abbauwege keine genauen Kenntnisse. In dieser Hinsicht liefert nun unsere Beobachtung über das Verhalten der Wasserstoffaktivierung im Sinne von Wieland in den beiden Systemen ein interessantes Bild. Es wurde nämlich

eine aktive Reduktion des Methylenblaus mittels der Thunberg'schen Methode namentlich im Muskelsystem nachgewiesen, während das gleiche in dem Tumorgewebe gar nicht der Fall war.

Zu diesen Versuchen wurde dasselbe Material, wie ich es zu meinen vorhergehenden Versuchen verwendet habe, zerkleinert und gut gewaschen, um den Donator zu beseitigen. Dann wurde das Gewebe im Mörser zerrieben, *m/15* Phosphat-Puffer (P_H 7.38) zugesetzt und ein 10%iger Brei hergestellt. Als Donator diente dieselbe Zuckerlösung wie bei den vorhergehenden Versuchen und als Akzeptor *m/10000* Methylenblaulösung. Von dieser Lösung wurde je 1 ccm in das Vakuumrohr nach Thunberg eingebracht, mit der Vakuumpumpe 2 Minuten lang evakuiert, das Rohr in einen Thermostaten bei 40°C eingetaucht und die Zeit vom Eintauchen bis zur Entfärbung der Lösung bestimmt. Die Resultate sind in Tabelle VIII angegeben.

TABELLE VIII.

Vergleich der H_2 -Aktivierung des Tumor- und des Rotemuskelgewebes durch die Methylenblau-Methode nach Thunberg.

10% Gewebsbrei in <i>m/15</i> Phosphat- Puffer	Donator	Koferment	Entfärbungszeit
Tumor 1 ccm	1,1.10 ⁻² Mol Glukose 1 ccm	—	> 60'
„	„	Koferment-T 0.015 g	> 60'
Muskel 1 ccm	0.2 Proz. Candiolin 1 ccm	—	8'-10'
„	„	Nebennierenrinden- Extr. 0.0008 g	4'30"—8'30"

Wie aus der Tabelle VIII ersichtlich ist, wird bei Oxydation des Candiolins durch den Muskel die H_2 -Aktivierung stark gefördert. Im Falle der Glukose-Oxydation beim Tumorgewebe entsteht fast gar keine H_2 -Aktivierung, woraus sich vermuten lässt, dass bei der Oxydation des Tumorgewebes ein von der Hexosephosphat-Spaltung verschiedener Chemismus am Werke ist.

VI. DER TRIOSE-ABBAU DURCH VERSCHIEDENE GEWEBE.

Da der oben erwähnte Versuch über die H_2 -Aktivierung in den beiden Gewebsarten auf irgendwelche voneinander abweichende Abbauege der Kohlenhydrate hinwies, musste es sehr interessant und wünschenswert erscheinen zu studieren, ob die beiden Gewebe auch ein verschiedenes Verhalten gegen die Triose zeigen. Über das Auftreten von Glycerinaldehyd und Dioxyäceton als intermediäre Spaltprodukte beim Hexoseabbau gehen die Meinungen der Autoren auseinander. Embden (1912) betrachtete Glycerinaldehyd als Zwischenstufe, weil es durch Blut noch schneller als die Glukose gespalten wurde. Nach Bruno Mendel dagegen wurde die anaerobe Glykolyse von Tumorgewebe durch geringe Hinzufügung von Glycerinaldehyd stark gehemmt. Dieser Befund wurde auch von Rosenthal am Leber- und Tumorgewebe bestätigt.

Die Versuchsergebnisse des Verfassers über die Spaltung des Glycerinaldehyds durch Sarkom, roten Muskel und Leber sind in Tabelle IX zusammengestellt. Aus dieser Tabelle geht deutlich hervor, dass alle Gewebe Glycerinaldehyd nur sehr schlecht benützen. Im Sarkom ist die aerobe, ebenso wie die anaerobe Milchsäurebildung aus Glycerinaldehyd bedeutend geringfügiger als aus Glukose und in der Leber als aus Fruktose. Daher das Auftreten des Glycerinaldehyd als Zwischenstufe dieses Hexose-Abbaus ausgeschlossen werden kann. Nur das Verhalten von Rotemuskelgewebe gegen Glycerinaldehyd bedarf einiger Erwähnung. Wie aus der Tabelle ersichtlich, zeigt das Rotemuskelgewebe eine schwache, doch verhältnismässig stärkere Umwandlung des Glycerinaldehyds als Tumor und Leber. Ganz übereinstimmende Resultate haben wir auch bei der Methylenblau-Reduktion angetroffen, d.h. in Anwesenheit von Glycerinaldehyd als H_2 -Donator betrug bei den roten Muskeln die Entfärbungszeit 27'–32', während sie beim Tumor 60' betrug. Aber es ist zu früh aus diesem Befunde zu schliessen, dass das Glycerinaldehyd mit Sicherheit ein Zwischenprodukt im Hexosphosphatabbau durch das Muskelgewebe ist. Wir wollen nur behaupten, dass Glycerin-

TABELLE IX.

Glycerinaldehyd-Abbau durch verschiedene Gewebe.

37.5° PH = 7.5

Ringer-Lösung. NaCHO₃ = 2,5 · 10⁻² Mol.Glycerinaldehyd = 1,1 · 10⁻² Mol.

Gewebe	Versuchsnummer	Q ^{O₂}	Q ^{O₂} _M	Q ^{N₂} _M
Sarkom	1	-4.77	1.80	1.60
	2	-5.02	0	1.12
	3	-5.60	2.68	1.30
	Mittel	-5.13	0.82	1.34
Roter Muskel	1	-3.27	2.62	3.56
	2	-1.24	0.84	0.90
	3	-1.00	0.80	1.04
	Mittel	-1.83	1.42	1.83
Leber	1	-2.98	3.87	0.98
	2	-6.61	5.29	1.36
	Mittel	-4.79	4.58	1.17

aldehyd als Vorstufe der Milchsäure im Rotemuskelgewebe auftreten kann.

Betreffs des Dioxyacetons hat Iwasaki (1930) auf Grund seiner Untersuchungen mit Hefe unter Berücksichtigung der Gärungsgeschwindigkeit und der dabei entwickelten Wärme abgelehnt, das Dioxyaceton als Zwischenstufe der Hexosespaltung anzusehen. Virtanen (1930) fand, dass bei der Gärung durch Kolibazillen das Dioxyaceton schneller gespalten wird, als die Glukose, und sprach sich daher für die Annahme des Dioxyacetons als Zwischenstufe aus. Ausser diesen haben wir noch die Veröffentlichungen von Buchner (1910), Harden und Young (1912) über die Spaltung des Dioxyacetons durch Hefe, aber auch die Ergebnisse bei diesen Arbeiten stimmen nicht überein.

Auch in dieser Hinsicht habe ich einige Versuche angestellt. Die Arbeitsmethode und das Material waren dieselben wie in den vorherigen Versuchen. Das verwendete Dioxyaceton stammte von der Firma Kahlbaum. Die Resultate sind in Tabelle X angegeben.

Demnach wurde Dioxyaceton durch das Tumorgewebe unter

TABELLE X.

Dioxyaceton-Abbau durch verschiedene Gewebe.

37,5° PH = 7.5

Ringer-Lösung. $\text{NaHCO}_3 = 2,5 \cdot 10^{-2}$ Mol.Dioxyaceton = $1,1 \cdot 10^{-2}$ Mol.

Gewebe	Versuchsnummer	Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	$Q_M^{N_2}$
Sarkom	1	-14.68	13.21	11.94
	2	- 8.89	12.24	17.39
	3	- 6.41	11.54	13.92
	Mittel	- 9.99	12.39	14.41
Roter Muskel	1	—	—	4.73
	2	—	—	3.29
	Mittel	—	—	4.01
Leber	1	-12.89	11.58	22.86
	2	- 9.08	9.49	24.93
	Mittel	-10.97	10.53	23.89

TABELLE XI.

Methylglyoxal-Abbau durch verschiedene Gewebe.

37,5° PH = 7.5

Ringer-Lösung. $\text{NaHCO}_3 = 2,5 \cdot 10^{-2}$ Mol.Methylglyoxal = $1,1 \cdot 10^{-2}$ Mol.

Gewebe	Versuchsnummer	Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	$Q_M^{N_2}$
Sarkom	1	-1.77	18.63	22.65
	2	-0.76	33.57	20.73
	3	—	—	24.67
	Mittel	-1.26	26.10	22.68
Roter Muskel	1	-2.22	5.33	9.00
	2	—	—	2.19
	Mittel	-2.22	5.33	5.59
Leber	1	-6.59	17.14	27.97
	2	-9.41	26.35	47.22
	3	—	—	32.37
	Mittel	-8.0	21.74	35.85

aeroben und anaeroben Bedingungen stark angegriffen. Aber die Milchsäurebildungsgeschwindigkeit im Tumorgewebe ist mit Dioxyaceton langsamer als mit Glukose, dagegen ist sie im Muskelgewebe fast dieselbe wie mit Hexosediphosphat und in der Leber grösser als mit Fruktose. Daher ist die Behauptung gegeben, dass im Muskel und in der Leber Dioxyaceton ein intermediäres Spaltprodukt ist.

Betreffs des Methylglyoxals ist schon allgemein anerkannt, dass diese Substanz als unmittelbare Vorstufe für die Milchsäure beim anaeroben Zuckerabbau auftritt. Auch meine Untersuchungen, (Tabelle XI), sprechen dafür.

Zusammenfassend sei erwähnt, dass die Tumor- und Muskelgewebe auffallende Unterschiede im Glukose- und Hexosephosphatabbau zeigen, dass diese aber im Trioseabbau keine nennenswerten sind.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Geschwindigkeit der Glukose-Spaltung durch unser Kaninchensarkom ist anaerob wie aerob sehr gross, weshalb es sich hier um eine bösartige Geschwulst handelt; beim Mäusekrebs aber ist sie anaerob gross, aber aerob sehr verkleinert, zeigt also vielmehr die Natur einer gutartigen Geschwulst.

2. Die Glukosespaltung durch das Kaninchensarkom, den Mäusekrebs, das Zwerchfell (Maus) und die Hirnrinde (Meerschweinchen) ist sehr gross, aber der Candiolin-Abbau durch diese Gewebe ist nur sehr gering. Im Gegensatz hierzu spalten die rote Muskulatur (Kaninchen) und die Leber (Maus) Candiolin besser als Glukose.

3. Das Koferment-T aus unserem Kaninchensarkom aktiviert den Glukose-Abbau des Kaninchensarkoms, des Zwerchfells und der Niere, aber nicht den der roten Muskulatur und der Leber.

4. Die Hexokinase aus Hefe aktiviert den Glukose-Abbau der roten Muskulatur, aber hat keinen Einfluss auf den des Tumorgewebes.

5. Der Nebennierenrinden-Extrakt vermag das Koferment der roten Muskulatur zu ersetzen; also aktiviert er den Zucker-

abbau der roten Muskulatur, nicht aber den des Tumorgewebes.

6. Im Rotemuskelgewebe sind Phosphatase ebenso wie Phosphatase in grossen Mengen vorhanden. Im Tumorgewebe ist fast gar keine Phosphatase vorhanden, dagegen eine grosse Menge Phosphatase.

7. Die Oxydation des Candiols durch den Muskel ist von starker H_2 -Aktivierung begleitet, dagegen entsteht im Falle der Glukose-Oxydation durch das Tumorgewebe fast gar keine H_2 -Aktivierung.

8. Die Spaltungsgeschwindigkeit der Triose ist bei Methylglyoxal am grössten, danach folgt in der Reihe das Dioxyaceton, und am geringsten ist die des Glycerinaldehyds.

Herrn Prof. Dr. K. Kodama bin ich für die gütige Leitung und die Durchsicht meines Manuskriptes, Herrn Prof. Dr. R. Kaneko für sein förderndes Interesse zu herzlichem Dank verpflichtet. Herr Dr. T. Omori hat mich bei der Untersuchung in wirksamer Weise unterstützt; auch ihm spreche ich meinen besten Dank aus.

LITERATUR.

- Aschford, Ch. A., Holmes, E. G. (1929): *Biochem. Journal*, **23**, 757.
 Barrenscheen, H. K. (1930): *Biochem. Zeitschr.*, **229**, 214.
 Buchner, E. (1910): *Berichte d. Chem. Gesell. Berlin*, **43**, 1773.
 Bumm, E., Fehrenbach, K. (1930): *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, **193**, 239.
 Dakin, H. D., Duddley, H. W. (1913): *Journal of biolog. Chem.*, **14**, 155, 423.
 Edlerbacher, S., Kutschr, W. (1931): *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, **199**, 202.
 Emden, G. (1912): *Biochem. Zeitschr.*, **45**, 45.
 Euler (1925): *Pflüger's Archiv*, **210**, 521.
 Euler (1928): *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, **177**, 174.
 Euler, H., Myrbäck, K. (1931): *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, **199**, 189.
 Fischer, H. D., Traube, C. (1924): *Berichte d. Chem. Gesellschaft. Berlin*, **57**, 1502.
 Fiske, C. H., Subarrow, Y. (1925): *Journal of biolog. Chem.*, **66**, 375.
 Gyorgi, St. (1928): *Biochem. Journal*, **22**, 1393.
 Harden, A., Young, W.: *Proc. Roy. Soc. London*, **78**, 369.
 „ „ (1912): *Biochem. Zeitschr.* **40**, 458.
 Iwasaki, K. (1928): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **203**, 242, 250.

- Kay, H. D. (1928): Biochem. Journal, **22**, 855.
- Kraut, H., Fehrenbach, K. (1930): Zeitschr. f. physiol. Chemie, **193**, 240.
- Kraut, H., Bumm, E. (1928): Zeitschr. f. physiol. Chemie, **177**, 134.
- Lobel, R. O. (1925): Biochem. Zeitschr., **161**, 219.
- Lohmann, K. (1931): Naturwissenschaft, **19**, 180.
- „ (1918): Zeitschr. f. physiol. Chemie, **101**, 165.
- Meyerhof, O. (1920): Archiv. f. d. ges. Physiol., **185**, 114.
- „ (1924): Biochem. Zeitschr., **150**, 10.
- „ (1926): Biochem. Zeitschr., **178**, 463.
- „ (1927): Biochem. Zeitschr., **183**, 186.
- Nagai, S. (1932): Journal of biochem., **16**, 383.
- Neuberg, C. (1927): Biochem. Zeitschr., **182**, 475.
- „ (1913): Biochem. Zeitschr., **49**, 502; **51**, 484.
- Okamoto, Y. (1925): Biochem. Zeitschr., **160**, 54.
- Riesser, O. (1926): Zeitschr. f. physiol. Chemie, **161**, 149.
- Rosenthal, O. (1930): Zeitschr. f. Krebsforschung, **32**, 221.
- Tokumitsu, B. (1917): Nisshin-Igaku, 1316.
- Tsukano, M. (1932): Journal of biochem., **15**, 479.
- Virtanen, I. (1930): Zeitschr. f. physiol. Chemie, **187**, 10.
- Warburg, O. (1926): Über den Stoffwechsel d. Tumoren.
- „ (1924): Biochem. Zeitschr., **152**, 51.
- „ (1924): Biochem. Zeitschr., **152**, 318.
- Watermann, N.: Archiv. Néel. de physiol., **9**, 573.

ÜBER DIE STERINE DES REISEMBRYOS. (I)

VON

KEIZO TANAKA.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut zu Okayama.

Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 29. März 1933.)

Im Pflanzenreich kommen viele verschiedene Sterine vor, wie Sitosterin (1918, 1926), Stigmasterin (1906, 1907), Ergosterin (Provitamin D) (1908, 1911, 1923), Zymosterin (1928, 1929), Neosterin, Fäcosterin, Ascosterin (1929) und Vitamin D.

Was nun die Sterine im Reisembryo anbetrifft, so haben diese schon früher mehrere Autoren, wie Weinhausen (1917), Takahashi (1919), und Hirai (1924) untersucht und gefunden, dass sie hauptsächlich aus Sitosterin nach Burian (1897) bestehen. Weinhausen hat in Reiskleie ein Sitosterin, dessen Schmelzpunkt $131-133^{\circ}\text{C}$ und $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -24.62^{\circ}$ ist, und einen gesättigten Kohlenwasserstoff ($\text{C}_{27}\text{H}_{48}$), dessen Schmelzpunkt $79.5-80.5^{\circ}\text{C}$ ist, gefunden. Nach Takahashi soll dieses Phytosterin, Schmelzpunkt 136°C und $[\alpha]_{\text{D}}^{02} = -25.12^{\circ}$, sein, und nach Hirai sollen zwei Sterine im Reisembryo vorkommen, von denen das eine den Schmelzpunkt 137°C und $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -23.5^{\circ}$ und das andere den Schmelzpunkt 144°C und $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -20.6^{\circ}$ hat.

Neuerdings haben Anderson (1924, 1925) und Bonstedt (1928) bewiesen, dass im Sitosterin aus den Endospermen von Mais, Weizenkeimlingen und verschiedenen Gramineen ein etwas rechtsdrehendes Dihydrositosterin beigemischt vorhanden ist. Wie oben erwähnt, haben Wieland und Asano (1929) und MacLean (1928) aus Hefe verschiedene rechtsdrehende Phytosterine, wie Fäcosterin, Ascosterin und Zymosterin isoliert.

Es scheint daher möglich zu sein, dass auch im Steringemisch aus dem Reisembryo irgendein rechtsdrehendes Sterin beigemischt vorhanden ist. So wurde aus dem Steringemisch des Reisembryos durch fraktionierte Kristallisation ein rechtsdrehendes Dihydrositosterin 0.35 g gewonnen, welches bei 145°C schmilzt und

$[\alpha]_D^{20} = +25.0^\circ$ hat. Sein Acetat schmilzt bei 140°C und hat $[\alpha]_D^{20} = +12.3^\circ$. Dies stimmt mit Anderson und Nabenhauer (1925) überein.

Nach Anderson (1926) sollen 3 Arten von Sitosterin vorkommen, welche er als α -, β - und γ -Sitosterin unterschieden hat, von denen α -Sitosterin mit dem Para-Sitosterin nach Burian (1897) identisch ist. Die Unterschiede sollen nach Anderson auf der Isomerie des asymmetrischen Kohlenstoffatoms im Sitosterinmoleküle beruhen.

Um diese Isomere im Reisembryo zu isolieren, wurde zuerst das Steringemisch nach der Methode von Windaus und Hauth (1906) in Acetatbromide übergeführt, in die in Methylalkohol leichtlöslichen und schwerlöslichen Teile getrennt, und aus den letzteren das Stigmasterinacetattetrabromid beseitigt. Bei der Bromierung habe ich deutlich die tiefgrüne Farbe der Tortelli-Jaffeschen Reaktion, herrührend von dem Ergosterin als Provitamin D, bemerkt. Dieses Acetatbromid wurde mit Zinkstaub in Eisessig debromiert, das dadurch erhaltene Sitosterinacetat fraktionierter Kristallisation in Alkohol unterworfen, und jede Fraktion aus Alkohol mehrmals (etwa 30 mal) umkristallisiert, bis die optische Drehung und der Schmelzpunkt konstant blieben. Man erhielt so ein γ -Sitosterinacetat, das bei 142 – 143° schmilzt und $[\alpha]_D^{20} = -46.09^\circ$ hat. Durch Verseifung dieses Acetates wurde γ -Sitosterin erhalten, das bei 144 – 145°C schmilzt und $[\alpha]_D^{20} = -42.8^\circ$ hat. Durch Hydrierung des γ -Sitosterinacetates wurde das Dihydro- γ -Sitosterinacetat gewonnen, das bei 143 – 144°C schmilzt und $[\alpha]_D^{20} = +9.97^\circ$ hat, und durch Verseifung wurde ein Isomer des natürlichen Dihydrositosterins, Dihydro- γ -Sitosterin gewonnen, das bei 143 – 144°C schmilzt und $[\alpha]_D^{20} = +18.89^\circ$ hat. Das in Methylalkohol leichter lösliche Acetatbromid wurde debromiert. Weiter wurde durch fraktionierte Kristallisation aus Alkohol ein isomeres β -Sitosterinacetat erhalten, das bei 127 – 128°C schmilzt und $[\alpha]_D^{20} = -39.0^\circ$ hat. Aus diesem Acetat wurde Dihydro- β -Sitosterinacetat, β -Sitosterin und Dihydro- β -Sitosterin gewonnen. Leider konnte ein mit dem natürlichen identisches Dihydrositosterin weder aus γ -Sitosterin noch aus β -Sitosterin hergestellt werden.

Was die Zahl der Kohlenstoffatome im Moleküle des Sitosterins, Stigmasterins und anderer Sterine anbetrifft, so haben sich auf Grund der Untersuchungen von Sandqvist und Bengtson (1930-1931) und Windaus u. seinen Mitarbeitern (1932) die Formeln $C_{27}H_{46}O$ für Sitosterin (1897, 1926) und $C_{30}H_{50}O$ für Stigmasterin (1924) nicht eingebürgert, sondern es hat sich herausgestellt, dass die Formeln $C_{29}H_{50}O$ für Sitosterin und $C_{29}H_{48}O$ für Stigmasterin am besten passen.

Der Analysenwert von Sitosterinacetat und Dihydrositosterinacetat aus Reisembryonen stimmt am besten mit der neuen Formel $C_{29}H_{50}O$ des Sitosterins nach Sandqvist und Windaus überein.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

50 kg gereinigte Reisembryonen wurden mit der 4-fachen Menge von 90% igem Alkohol extrahiert, und das von Alkohol befreite, dunkelgrünlich-braune Öl (ca. 5 kg) wurde nach der Methode von Takahashi (1923) verseift und von Fettsäuren wie Kalkseifen befreit. Der aus Ätherextrakt gewonnene unverseifbare Anteil betrug insgesamt 250 g. Die Masse ist gelblich, riecht reizend und zeigt deutliche Liebermann-Burchardsche Reaktion. Aus Methylalkohol wurde die unverseifbare Substanz in eine kristallisierte und eine syrupöse nicht kristallisierte Fraktion geteilt, von denen die letztere zu anderen Zwecken vor Sonnenlicht geschützt aufbewahrt wurde.

Die aus Methylalkohol kristallisierte Fraktion betrug 85 g und zeigte die Liebermann-Burchardsche Reaktion, und zwar erst hellrot - violet, dann blauviolett - blau, endlich dunkelgrün. Der Kristall gibt auch die Salkowskische Reaktion mit grüner Fluoreszenz und die Tortelli-Jaffesche Reaktion (1915). Mit dem Kristall kann auch die Rosenheimsche Reaktion (1929) gezeigt werden, und zwar mit Chloralhydrat erst karminrot, dann grün und schliesslich mit blauem Ton. Bei der Trichloresigsäurereaktion tritt erst eine rosarote, dann eine blaue Farbe auf, und bei der Antimontrichloridreaktion erst eine purpurrote, dann eine hellblaue Farbe. Durch die Farbenreaktion wird wahrschein-

lich gemacht, dass im Steringemisch Sterine der Cholesterinreihe und der Ergosterinreihe enthalten sind.

Das Steringemisch wurde also in absolutem Alkohol gelöst, der fraktionierten Kristallisation unterworfen und nach der Löslichkeit in 6 Teile getrennt. Der Schmelzpunkt und die Drehung jeder Fraktion sind in der folgenden Tabelle I zusammengefasst.

TABELLE I.

Nr..	Menge von Alkohol (ccm) bei der Kristall. abgeschieden	Schmelzp. (C°)	$[\alpha]_D^{20}$ in Chloroform	Konzentration der Drehung. (%)
1	2000	95-98	-16.50	2.0
2	1800	110-112	-19.70	3.0
3	1500	137-138	-26.50	2.0
4	1000	145-146	-23.70	1.5
5	400	147	-28.10	1.5
6	100	141-142	-26.90	2.0

1. Mylicylalkohol.

Die Fraktionen 1 und 2 wurden vereinigt und mit absolutem Alkohol mehrmals (20-25 mal) umkristallisiert, bis die Farbenreaktionen nach Salkowski, und Liebermann-Burchard nicht mehr auftraten, und die Lösung gelatinös wurde. Aus Essigäther wurde ein haardünner Nadelkristall abgeschieden, der bei 86-87°C schmilzt und keine optische Aktivität besitzt. Die Ausbeute betrug 4.0 g.

Analyse:

4.571, 4.542 mg Substanz ergaben 13.825, 13.730 mg CO₂ und
5.740, 5.800 mg H₂O.

C₃₀H₆₂O ber. C 82.10% H 14.24%
gef. „ 82.48, 82.45% „ 14.08, 14.29%

Das Acetat schmilzt bei 71-72°C.

Analyse:

4.911 mg Substanz ergaben 14.555 mg CO₂ u. 5.920 mg H₂O.

C₃₂H₆₄O ber. C 80.21% H 13.43%
gef. „ 80.86% „ 13.49%

Das Benzoat schmilzt bei 70°C.

Nach allen seinen Eigenschaften und der Analyse ist der Kristall ein Mylicylalkohol.

2. Dihydrositosterin.

80 g Steringemisch, aus dem der Mylicylalkohol ganz entfernt war, wurden aus soviel absolutem Alkohol umkristallisiert, dass der Kristall bei Siedetemperatur eben in Lösung blieb. Diese Behandlung wurde wiederholt, und dabei wurde bemerkt, dass der Schmelzpunkt des Kristalls desto mehr gesteigert wird, und dass seine optische Drehung desto mehr von links nach rechts übergeht, je mehr Umkristallisationen ausgeführt werden, wie in der Tabelle II angegeben ist.

TABELLE II.

Anzahl der Kristallisationen	Menge (g)	Schmelzpt. (C)	$[\alpha]_D^{20}$: in Chloroform	Konzentration der Drehung (%)
15	12.3	139–140	–29.30	2.0
20	5.1	140–141	–26.30	2.0
25	2.5	141–142	–15.60	2.5
35	0.9	143	+ 3.8	2.0
40	0.6	144	+11.9	3.0

Dadurch wurde wahrscheinlich gemacht, dass im Steringemisch ein rechtsdrehendes Sterin beigemischt ist. Somit wurde seine Trennung nach der Methode von Anderson und Nabenhauer (1925) ausgeführt.

0.6 g Substanz ($[\alpha]_D^{20} = +11.9^\circ$ und Schmelzpunkt 144°C) wurden in Tetrachlorkohlenstofflösung mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure acetyliert, und der von Tetrachlorkohlenstoff befreite Rückstand wurde mit alkoholischem Kali verseift. Die dadurch ausgeätherte Masse wurde aus Alkohol wiederholt umkristallisiert. Dabei erhielt man einen Kristall in schönen, grossen, seidigglänzenden Blättchen, der bei 145°C schmilzt. Die Ausbeute betrug 0.35 g.

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +25.0^\circ$ (0.2 g in 10 ccm Chloroform, $[\alpha] = +0.5^\circ$, 1 dm).

Er zeigte keine Farbenreaktionen nach Salkowski, Liebermann-Burchard und Tortelli-Jaffe. Die in der Luft getrocknete Substanz (0.106 g) verlor beim Trocknen im Vakuum über Phosphorpentachlorid bei 105°C 0.0045 g an Gewicht, d. h. 4.245%.

für $\text{C}_{29}\text{H}_{52}\text{O} + \text{H}_2\text{O}$	ber. H_2O	4.147%
	gef. „	4.245

Analyse:

5.109, 5.130, 5.038 mg Substanz ergaben 15.015, 15.120, 14.815 mg CO_2 und 5.540, 5.750, 5.620 mg H_2O .

$\text{C}_{29}\text{H}_{52}\text{O} + \text{H}_2\text{O}$	ber. C	80.18%	H	12.45%
	gef. „	80.15,	80.38,	80.20%

H 12.14, 12.54, 12.48%

Ein Teil der Substanz wurde in üblicher Weise mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Das Acetat kristallisiert in seidigglänzenden sechseitigen Blättchen. Es schmilzt bei 140°C .

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +12.3$ (0.2 g in 10 ccm Chloroform, $[\alpha] = +0.246$, 1 dm).

Analyse:

4.715, 4.831 mg Substanz ergaben 13.970, 14.370 mg CO_2 und 4.970, 5.060 mg H_2O

$\text{C}_{31}\text{H}_{54}\text{O}_2$	ber. C	81.12%	H	11.89%
	gef. „	81.00,	81.16%	„ 11.82, 11.72%

Das übrige vereinigte Steringemisch, aus welchem Mylicylalkohol und Dihydrositosterin entfernt worden waren, wurde in der üblichen Weise mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Diese Acetate wurden nach ihrer Löslichkeit in absolutem Alkohol in 5 Fraktionen geteilt und aus Alkohol mehrmals umkristallisiert, wie in der Tabelle III angegeben ist.

Die erste Fraktion, ca 4.2 g, vom Schmelzpunkt $135\text{--}136^\circ\text{C}$ und $[\alpha]_D^{20} = -40.10$, wurde wieder nach der Löslichkeit in 4 Fraktionen geteilt und aus Alkohol mehrmals umkristallisiert, wie aus der folgenden Tabelle zu ersehen ist.

TABELLE III.

Nr.	Zahl der Umkristallisationen	Schmelzpt. (C°)	$[\alpha]_D^{20}$: in Chloroform	Konzentration der Drehung (%)
1	5	121–122	–33.80	2.0
2	10	126–127	–38.10	2.0
3	15	129–130	–39.20	1.5
4	20	133–134	–39.80	2.0
5	25	135–136	–40.10	2.0

TABELLE IV.

Nr.	Zahl der Umkristallisationen	Schmelzpt. (C°)	$[\alpha]_D^{20}$: in Chloroform	Konzentration der Drehung (%)
1	10	138	–41.90	3.0
2	15	139	–42.30	2.0
3	20	140	–42.50	2.0
4	25	142	–44.10	2.0

3. Stigmasterinacetattetrabromid.

Die erste Fraktion, 1.5 g, vom Schmelzpunkt 142°C und $[\alpha]_D^{20} = -44.10$, wurde in Äther nach der Methode von Windaus und Hauth (l. c.) bromiert, und aus der in Äther unlöslichen Fraktion des Bromids wurde unter Umkristallisation aus einem Gemisch von Benzol und Äther ein Kristall in vierseitigen Blättchen erhalten, der bei 210–211°C schmilzt. Dieser ist höchstwahrscheinlich Stigmasterinacetattetrabromid. Die Ausbeute betrug 0.02 g. Die allmähliche Steigerung des Schmelzpunktes und der optischen Drehung des Acetates (Tabelle IV) bei der fraktionierten Umkristallisation dürfte wohl auf die Beimengung dieses Stigmasterinacetates zurückzuführen sein.

4. Sitosterin.

Das in den Tabellen III und IV angegebene gesamte Sterinacetat wurde in Äther mit Bromeisessiggemisch bromiert. Das Reaktionsgemisch wurde mit Methylalkohol versetzt. Beim Erkal-

ten schied sich ein Nadelkristall ab. Das Filtrat wurde zur Isolierung von β -Sitosterinacetat benutzt. Bei der Bromierung wurde die Lösung erst gelblich grün, hellgrün und dann allmählich dunkelgrün. Dies scheint mir wohl auf der Tortelli-Jaffeschen Reaktion für Ergosterin zu beruhen. Diese Farbenreaktion bei der Bromierung trat in der in Alkohol leichtlöslichen Fraktion stärker auf. Das weist darauf hin, dass das Ergosterin hauptsächlich der in Alkohol leichtlöslichen Fraktion beigemengt ist. Die Ausbeute an dem ausgeschiedenen Nadelkristall betrug 9.2 g. Dieses Bromid wurde in Äther gelöst, und das aus der in Äther unlöslichen Fraktion erhaltene Bromid aus dem Gemisch von Benzol und Äther umkristallisiert; es kristallisiert in Blättchen und schmilzt bei 210°C. Dies ist höchstwahrscheinlich Stigmasterinacetattetrabromid. Die davon befreite ätherische Lösung wurde mit Eisessig gefällt. Die Fällung wurde in Eisessig mit Zinkstaub debromiert, und der nicht debromierbare Anteil, der wahrscheinlich α -Sitosterinacetatdibromid ist, wurde nach seiner Löslichkeit in Eisessig getrennt.

γ -Sitosterinacetat.

Das debromierte Sterinacetat wurde aus Alkohol 30mal umkristallisiert. Die ersten 5 Mutterlaugen lieferten Fraktion I und die der 6. bis 10. Kristallisation Fraktion II, was in folgender Tabelle gezeigt wird:

TABELLE V.

	Schmelzpt. (C°)	$[\alpha]_D^{20}$: in Chloroform	Konzentration der Drehung (%)
I	130	-40.10	3.0
II	135-143	-41.20	2.0
Anzahl der Um- kristallisationen			
15	140-141	-43.80	2.0
30	142-143	-46.09	2.0

Die Fraktion II wurde noch 15-30mal aus Alkohol umkristallisiert, wodurch der Schmelzpunkt, der dem von γ -Sitosterinacetat

entspricht, konstant blieb. Die Substanz ist ganz schwer löslich in Methyl- und Äthylalkohol, aber sehr leicht löslich in Chloroform und Äther. Die Ausbeute betrug 0.38 g. Sie kristallisiert in schönen, feinen Tafeln und schmilzt bei 142–143°C.

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -46.09^\circ$ (0.2 g in 10 ccm Chloroform, $[\alpha] = -0.9218^\circ$, 1 dm)

Analyse:

4.525, 4.729 mg Substanz ergaben 13.510, 13.485 mg CO₂ und
4.620, 4.560 mg H₂O

C₃₁H₅₂O₂ ber. C 81.50% H 11.48%
gef. „ 81.45, 81.65% „ 11.43, 11.33%

β-Sitosterinacetat.

Das von dem kristallisierten Bromid befreite Filtrat wurde mit Zinkstaub und Eisessig debromiert; das dadurch erhaltene Sterinacetat betrug 5.0 g. Aus diesem wurde bei mehrmaliger Umkristallisation ein Tafelkristall erhalten, der bei 127–128°C schmilzt. Er ist in Alkohol viel leichter löslich als das γ-Sitosterinacetat.

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -39.0^\circ$ (0.25 g in 10 ccm Chloroform, $[\alpha] = -0.975^\circ$, 1 dm).

Der optische Drehungsgrad ist viel niedriger, und besonders der Schmelzpunkt liegt viel tiefer bei β-Sitosterinacetat als bei γ-Sitosterinacetat.

Analyse:

4.938, 4.643 mg Substanz ergaben 14.730, 13.850 mg CO₂ und
4.950, 4.720 mg H₂O

C₃₁H₅₂O₂ ber. C 81.50% H 11.48%
gef. „ 81.60, 81.57% „ 11.25, 11.41%

Dihydro-γ-Sitosterinacetat.

0.15 g γ-Sitosterinacetat vom Schmelzpunkt 142–143°C wurde in Eisessig mit Platinoyd und Wasserstoff hydriert; der dadurch erhaltene grosse, seidigglänzende Tafelkristall schmilzt bei 143–144°C. Dieser entspricht in allen Eigenschaften dem Dihydro-γ-Sitosterinacetat. Er ist am schwersten löslich in Alkohol. Er zeigt keine Farbenreaktionen nach Salkowski und Liebermann-

Burchard.

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +9.7^\circ$ (0.1 g in 10 ccm Chloroform, $[\alpha] = +0.097^\circ$, 1 dm).

Analyse:

4.695, 4.917 mg Substanz ergaben 13.970, 14.590 mg CO_2 und
4.910, 5.170 mg H_2O

$\text{C}_{31}\text{H}_{54}\text{O}_2$ ber. C 81.12% H 11.89%
gef. „ 81.18, 81.06% „ 11.70, 11.78%

Dihydro- β -Sitosterinacetat.

0.15 g β -Sitosterinacetat vom Schmelzpunkt $127\text{--}128^\circ\text{C}$ wurde mit Platinoyd und Wasserstoff hydriert; der aus dem Reaktionsgemisch erhaltene grosse Tafelkristall schmilzt bei $137\text{--}138^\circ\text{C}$. Diese Reduktion des β -Sitosterinacetates war viel schwieriger und ging langsamer vor sich als die des γ -Sitosterinacetates, und man musste unter wiederholter Behandlung mit Wasserstoff und frischem Katalysator hydrieren.

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +13.57^\circ$ (0.1 g in 10 ccm Chloroform, $[\alpha] = +0.1357^\circ$, 1 dm).

Der Schmelzpunkt von Dihydro- β -Sitosterinacetat liegt tiefer, aber der Drehungsgrad ist höher als bei Dihydro- γ -Sitosterinacetat.

Analyse:

4.666, 5.100 mg Substanz ergaben 13.850, 15.130 mg CO_2 und
4.780, 5.360 mg H_2O

$\text{C}_{31}\text{H}_{54}\text{O}_2$ ber. C 81.12% H 11.89%
gef. „ 81.00, 80.94% „ 11.68, 11.76%

 γ -Sitosterin.

0.2 g γ -Sitosterinacetat wurden in üblicher Weise mit Kali verseift; der dadurch gewonnene, aus Alkohol umkristallisierte Tafelkristall schmilzt bei $144\text{--}145^\circ\text{C}$. Er gab die Reaktionen nach Salkowski und Liebermann-Burchard, aber keine Tordelli-Jaffesche Reaktion. Die in der Luft bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Substanz hat ein Mol Kristallwasser.

0.125 g Substanz verloren im Vakuum über Phosphorpentachlorid bei 105°C 0.0052 g.

Für $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ ber. 4.166%

gef. 4.160%

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -42.8^\circ$ (0.15 g in 10 ccm Chloroform, $[\alpha] = -0.642^\circ$, 1 dm).

Analyse:

4.922, 4.714 mg Substanz ergaben 15.170, 14.535 mg CO₂ und
5.260, 4.93 mg H₂O

C₂₉H₅₀O ber. C 83.98% H 12.16%
gef. „ 84.05, 84.09% „ 11.98, 11.72%

β-Sitosterin.

0.25 g β-Sitosterinacetat wurde mit alkoholischem Kali verseift; aus dem Verseifungsgemisch wurde das β-Sitosterin in Tafelkristallen erhalten. Es schmilzt bei 139–140°C.

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -37.7^\circ$ (0.2 g in 10 ccm Chloroform, $[\alpha] = -0.754^\circ$ 1 dm).

Analyse:

5.003, 4.471 mg Substanz ergaben 15.440, 13.785 mg CO₂ und
5.410, 4.790 mg H₂O

C₂₉H₅₀O ber. C 83.98% H 12.16%
gef. „ 84.02, 84.09% „ 12.10, 11.99%

Dihydro-γ-Sitosterin.

0.15 g γ-Sitosterin wurde in Eisessig mit Platinoxid und Wasserstoff hydriert, und aus dem Reaktionsgemisch Dihydro-γ-Sitosterin in grossen seidigglänzenden Tafeln erhalten. Es schmilzt bei 143–144°C. Es zeigte keine Farbenreaktionen nach Salkowski und Liebermann-Burchard.

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +18.89^\circ$ (0.1 g in 10 ccm Chloroform, $[\alpha] = +1.889^\circ$, 1 dm).

Analyse:

4.813, 5.118 mg. Substanz ergaben 14.205, 15.140 mg CO₂ und
5.380, 5.720 mg H₂O

C₂₉H₅₂O ber. C 80.18% H 12.45%
gef. „ 80.47, 80.69% „ 12.51, 12.51%

Dihydro-β-Sitosterin.

0.12 g β-Sitosterin wurde in Eisessig mit Platinoxid und Wasserstoff hydriert, und aus dem Reaktionsgemisch ein grosser

Tafelkristall erhalten, der bei 139–140°C schmilzt.

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = +24.0^\circ$ (0.1 g in Chloroform, $[\alpha] = +0.24$, 1 dm).

Der Schmelzpunkt von Dihydro- β -Sitosterin liegt tiefer, aber der Drehungsgrad ist höher als bei Dihydro- γ -Sitosterin.

LITERATUR.

- Anderson, R. J. u. Nabenhauer, F. P. (1924): Amer. Chem. Soc., **45**, 1944.
Anderson, R. J. u. Nabenhauer, F. P. (1925): Amer. Chem. Soc., **46**, 1717 u. 1957.
Anderson, R. J. u. Shringer, R. L. (1926): Amer. Chem. Soc., **48**, 2976 u. 2981.
Bonstedt, K. (1928): Zeitschr. f. physiol. Chem., **176**, 269.
Burian, R. (1897): Monath. f. Chem., **18**, 551.
Goris, A. u. Maseré, M. (1911): C. R. **153**, 1082.
Hirai, S. (1924): Acta Med. Kyoto, **7**, 515.
MacLean, I. S. (1928): Bioch. J., **22**, 22.
Rosenheim, O. (1929): Bioch. J., **23**, 48.
Sandqvist, H. u. Bengston, E. (1930–1931): Chem. Ber., **63**, 1935 u. **64**, 2167.
Takahashi, K. (1923): Jl. of Chem. Soc. Japan, **44**, 590.
Takahashi, K. (1919): Jl. of Chem. Soc. Japan, **40**, 191.
Takahashi (1924): Chem. Ztg., **48**, 194.
Tanret, C. (1908): C. R., **147**, 75.
Tortelli-Jaffe (1915): Chem. Z., **39**, 14.
Weinhagen, A. B. (1917): Zeitschr. f. physiol. Chem., **100**, 159.
Wieland, H. u. Asano, M. (1929): Liebigs Ann., **473**, 300.
Windaus, A. u. Hauth, A. (1906–1907): Chem. Ber., **39**, 4378 u. **40**, 3681.
Windaus, A. u. Rahlen, E. (1918): Zeitschr. f. physiol. Chem., **101**, 230.
Windaus, A. u. Grosskopf, W. (1923): Zeitschr. f. physiol. Chem., **124**, 8.
Windaus, A. u. Brunken, J. (1924): Zeitschr. f. physiol. Chem., **140**, 48.
Windaus, A. Werder, F. V. u. Gscheider, B. (1932): Chem. Ber., **65**, 1006.

INDEX TO VOLUME XVII.

A

Acetonkörper, Über den — im Magensaft, zugleich über das Schicksal des l-Leucins in der Magenwand. 275.

ADACHI, T., KOZAWA, S. u. IWATSURU, R. Beiträge zur Rivalta'schen reaktion. 375.

Adrenalin, Blutphosphat bei Zufuhr von Cholsäure mit — und vegetatives Nervensystem. 1.

Adrenalin, Über den Einfluss der Ernährung auf die Wirkung des —s. 11.

Amino acid, The action of sugar on — — —. 147.

Amphibien, Beiträge zur Embryochemie der —. 401, 407, 109, 413, 417, 419.

Anorganische Bestandteile, Über das Verhalten der — — bei der Bebrütung des Riesensalamandereies. 409.

Avitaminotische Diät, Über die Beeinflussung der Hämoglykolyse durch die Nahrung, mit besonderer Berücksichtigung der — n —. 171, 215.

B

Bebrütung, Über das Verhalten der anorganischen Bestandteile bei der — des Riesensalamandereies. 409, 413, 417, 419.

Blood, On the effect of insulin, epinephrine and phlorhizin on the lactic acid content and the distribution of phosphates in the — of rabbits. 61.

Blutgerinnung, Untersuchung über die —. 117.

Blutphosphat bei Zufuhr von Cholsäure mit Adrenalin und vegetatives Nervensystem. 1.

C

Calciumstoffwechsel, Einfluss der Gallensäure auf den —. 29.

CHIWAKI, JINJI. Über die Beeinflussung der Hämoglykolyse durch die Nahrung, mit besonderer Berücksichtigung der avitaminotischen diät.

II. Mitteilung. Die Verhältnisse zwischen der Abschwächung der Glykolyse und der Verteilung des freien und gebundenen Cholesterins im Kaninchenblute bei der Fütterung mit Cholesterin. 171.

III. Mitteilung. Die Hämoglykolyse der mit poliertem Reis gefütterten Kaninchen. 215.

Cholesterin, Die Verhältnisse zwischen der Abschwächung der Glykolyse und der Verteilung des freien und gebundenen —s im Kaninchenblute bei der Fütterung mit Cholesterin. 171.

Cholsäure, Blutphosphat bei Zufuhr von — mit Adrenalin und vegetatives Nervensystem. 1.

Clinical methods, On the accuracy of some — — of estimating the protein present in the urine. 367.

D

d-Alanin, Durchblutung des Magens

- mit dl-Alanin und ——. 267.
 Dehydrocholsäure, Über das Schicksal
 der — im Hundeorganismus.
 159.
 Dehydrocholsäure, Über das Schicksal
 der — im Krötenorganismus.
 385.
 Diketopiperazinring, Über fermenta-
 tive Aufschliessung des —s.
 285.
 dl-Alanin, Durchblutung des Magens
 mit — und d-Alanin. 267.

E

- Electrolyt, Über den Einfluss der
 —en auf die Phosphomono-
 esterase und Pyrophosphatase.
 343.
 Embryochemie, Beiträge zur — der
 Amphibien. 401, 407, 409, 413,
 417, 419.
 Epinephrin, On the effect of insulin,
 — and phlorhizin on the lactic
 acid content and the distribution
 of phosphates in the blood of
 rabbits. 61.
 Ernährung, Über den Einfluss der
 — auf die Wirkung des Ad-
 renalins. 11.

F

- Fettsubstanz, Über das Verhalten der
 —en bei der Bebrütung des
 Riesensalamandereies. 419.
 Fistelgalle, Beiträge zur Kenntnis der
 Gallensäure aus der — des
 Kaninchens. 391.
 FUJIWARA, HIDEKATSU u. TOMITA,
 MASAJI. Beiträge zur Embryo-
 chemie der Amphibien. 407.
 FUJIWARA, HIDEKATSU u. TSUNOO,
 SHIGERU. Beiträge zur Embryo-
 chemie der Amphibien. II. Phy-
 sikalische Eigenschaften der Peri-

vitellinflüssigkeit des Riesensala-
 mandereies. 407.

- Funktionsstörung, Experimentelle
 Untersuchungen über die Ver-
 teilung der Kohlehydrate in den
 Organen und Geweben bei der
 Insulin- und Synthalin-Hypo-
 glykämie, beim Hunger sowie
 beim —en der Leber. 441.

G

- Gallensäure, Beiträge zur Kenntnis
 der — aus der Fistelgalle des
 Kaninchens. 391.
 Gallensäure, Einfluss der — auf den
 Calciumstoffwechsel IV. 29.
 Gallensäure, Einfluss der — auf den
 Phosphorstoffwechsel. 1.
 Gallensäure, Keimdrüsenautolyse unter
 dem Einfluss der —. 111.
 Gallensäure, Veränderungen im Kalk-
 zustand durch Zufuhr von —
 bei normaler sowie threopara-
 threopraver Hündin. 29.
 Gewebe, Über die geschlechtlichen
 Unterschiede des Oxydations- und
 Reduktionsvermögens in den
 —n. 135.
 Glykolyse, Die Verhältnisse zwischen
 der Abschwächung der — und
 der Verteilung des freien und
 gebundenen Cholesterins im
 Kaninchenblute bei der Fütterung
 mit Cholesterin. 171.
 Glykolytische Kofermente, Verglei-
 chende Untersuchungen über die
 verschiedenen —n —. 457.
 Glyoxalase, On muscle —. 307.

H

- Hämoglykolyse, Über die Beeinflus-
 sung der — durch die Nahrung,
 mit besonderer Berücksichtigung
 der avitaminotischen Diät. 171,
 215.

- HAYASHI, KATSUZO et NAKASHIMA, MINORU. Sur le potentiel d'oxydo-réduction de la réduction de la réline. 315.
- Histamin, Durchblutung des Magens mit ——. 261.
- HORI, Migiwa. On the accuracy of some clinical methods of estimating the protein present in the urine. 367.
- HOSHIZIMA, TADAO. Einfluss der Gallensäure auf den Calciumstoffwechsel IV. Veränderungen im Kalkzustand durch Zufuhr von Gallensäure bei normaler sowie thyreoparathyreopraver Hündin. 29.
- Hühnerembryo, Über die geschlechtlichen Unterschiede des Oxydations- und Reduktionsvermögens in den Geweben des ——. 135.
- Hundeorganismus, Über das Schicksal der Dehydrocholsäure im ——. 159.
- Hündin, Veränderungen im Kalkzustand durch Zufuhr von Gallensäure bei normaler sowie thyreoparathyreopraver ——. 29.
- Hunger, Experimentelle Untersuchungen über die Verteilung der Kohlehydrate in den Organen und Geweben bei der Insulin- und Synthalin-Hypoglykämie, beim —— sowie bei Funktionsstörungen der Leber. 441.
- Hypoglykämie, Über die Beziehungen der alimentären ——, sowie des "Staub"-Effectes zu verschiedenen Zuckerarten. 91.
- den Acetonkörper im Magensaft, zugleich über das Schicksal des l-Leucins in der Magenwand. 275.
- Insulin, Experimentelle Untersuchungen über die Verteilung der Kohlehydrate in den Organen und Geweben bei der —— und Synthalin-Hypoglykämie, beim Hunger sowie bei Funktionsstörungen der Leber. 441.
- Insulin, On the effect of —— epinephrine and phlorhizin on the lactic acid content and the distribution of phosphates in the blood of rabbits. 61.
- ISEKI, TOSHINORI und KUMON, TEKI. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. III. Über das Verhalten der anorganischen Bestandteile bei der Bebrütung des Riesensalamandereies. 409.
- ISEKI, TOSHINORI; KUMON, TEKI; TAKAHASHI, ICHIMATSU und YAMASAKI, FUJITO. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. IV. Über das Verhalten der N-haltigen Verbindungen bei der Bebrütung des Riesensalamandereies. 413.
- ISHIYAMA, TAKASHI. Über Fermentative Aufschliessung des Diketopiperazinrings. 285.
- IWATSURU, R., KOZAWA, S. u. ADACHI, T. Beiträge zur Rivalta'schen Reaktion. 375.

K

- IKEBE, K. Durchblutungsversuche des Magens. (Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsudji) III. Mitteilung. Über geschlechtlichen Unterschiede des Oxydations- und Reduktionsvermögens in den Geweben (Vierte Mitteilung). Über die geschlechtlichen Unterschiede des Oxydations- und Reduktionsver-

- mögens in den Geweben des Hühnerembryos. 135.
- Kaninchen, Beiträge zur Kenntnis der Gallensäure aus der Fistelgalle des —s. 391.
- Kaninchen, Die Hämoglykolyse der mit poliertem Reis gefütterten —. 215.
- KASHIWAMURA, OSAMU. Untersuchungen über die Blutgerinnung. I. Mitteilung. Über die aus der Niere erhaltene blutgerinnungshemmende Substanz. 117.
- KATAOKA, EISEI u. TAKAHASHI, ICHIMATSU. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. VI. Über das Verhalten der Fettsubstanzen bei der Bebrütung des Riesensalamandereies. 419.
- KATAOKA, EISEI u. TSUNOO, SHIGERU. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. V. Über den Kohlehydratstoffwechsel bei der Bebrütung des Riesensalamandereies 417.
- Keimdrüsenautolyse unter dem Einfluss der Gallensäure. III.
- Kofermente, Vergleichende Untersuchungen über die verschiedenen Glykolytischen —. 457.
- Kohlehydrate, Experimentelle Untersuchungen über die Verteilung der — in den Organen und Geweben bei der Insulin- und Synthalin-Hypoglykämie, beim Hunger sowie bei Funktionsstörungen der Leber. 441.
- Kohlehydratstoffwechsel bei der Bebrütung des Riesensalamandereies. 417.
- KOZAWA, S., IWATSURU, R. u. ADACHI, T. Beiträge zur Rivalta'schen reaktion. 375.
- Krötenorganismus, Über das Schicksal der Dehydrocholsäure im —. 385.
- KUMAMI, SHIRO. Über den Schwefelgehalt des arteriellen. bzw. venösen Blutes des Pankreas. 423.
- KUMON, TEKI u. ISEKI, TOSHINORI. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. III. Über das Verhalten der anorganischen Bestandteil bei der Bebrütung des Riesensalamandereies. 409.
- KUMON, TEKI; ISEKI, TOSHINORI; TAKAHASHI, ICHIMATSU u. YAMASAKI, FUJITO. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. IV. Über das Verhalten der Nhaltigen Verbindungen bei der Bebrütung des Riesensalamandereies. 413.
- KURAMOTO, TSUNEO u. YUUKI, HIDEO. Einfluss der Gallensäure auf den Phosphorstoffwechsel (III). Blutphosphat bei Zufuhr von Cholsäure mit Adrenalin und vegetatives Nervensystem. 1.

L

- l-Leucins, Über den Acetonkörper im Magensaft, zugleich über das Schicksal des — in der Magenwand. 275.
- Lactic acid, On the effect of insulin, epinephrine and phlorhizin on the — content and the distribution of phosphates in the blood of rabbits. 61.
- Leber, Experimentelle Untersuchungen über die Verteilung der Kohlehydrate in den Organen und Geweben bei der Insulin- und Synthalin-Hypoglykämie, beim Hunger sowie bei Funktionsstörungen der —. 441.

M

- Magen, Vorbemerkung zu Durchblut-

- ungsversuchen des —s. 259, 257, 261, 267.
- Magensaft, Über den Acetonkörper im —, zugleich über das Schicksal des l-Leucins in der Magenwand. 275.
- Magenwand, Über den Acetonkörper im Magensaft, zugleich über das Schicksal des l-Leucins in der —. 275.
- MATSUI, JUJIRO. Konstitution der Polypeptide und proteolytische Fermente. 163, 253..
- MATSUOKA, Y. Durchblutungsversuche des Magens. (Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsuji) II. Mitteilung. Durchblutung des Magens mit dl-Alanin und d-Alanin. 267.
- MATSUURA, KATSUMICHI. Experimentelle Untersuchungen über die Verteilung der Kohlehydrate in den Organen und Geweben bei der Insulin- und Synthalin-Hypoglykämie, bei Hunger sowie bei Funktionsstörungen der Leber. 441.
- MATSUZAKI, HARUO. Vergleichende Untersuchungen über die verschiedenen glykolytischen Kofenzyme. 457.
- Methylglyoxal, A note on measuring methods of —. 299.
- MUNEMURA, SANMATSU. Über den Einfluss der Electrolyten auf die Phosphomonoesterase und Pyrophosphatase. 343.
- Muscle, On — glyoxalace. 307.
- N**
- Nahrung, Über die Beeinflussung der Hämoglykolyse durch die —, mit besonderer Berücksichtigung der avitaminotischen diät. 171, 215.
- NAKASHIMA, MINORU et HAYASHI, KATSUZO. Sur le potentiel d'oxydo-réduction de la rétine. 315.
- Narcotin, The effect of irradiated — on experimental scurvy. 395.
- Nervensystem, Blutphosphat bei Zufuhr von Cholsäure mit Adrenalin und vegetatives —. 1.
- Niere, Über die aus der — erhaltene blutgerinnungshemmende Substanz. 117.
- O**
- Oxidizing agent, The action of sugar on amino acid in the presence of — —s. 147.
- Oxydation, Über die geschlechtlichen Unterschiede des —s- und Reduktionsvermögens in den Geweben. 135.
- P**
- Pankreas, Über den Schwefelgehalt des arteriellen bzw. venösen Blutes des —. 423.
- Perivitellinflüssigkeit, Physikalische Eigenschaften der — des Riesensalamandereies. 407.
- Phlorhizin, On the effect of Insulin, epinephrine and — on the lactic acid content and the distribution of phosphates in the blood of rabbits. 61.
- Phosphate, On the effect of insulin, epinephrine and phlorhizin on the lactic acid content and the distribution of —s in the blood of rabbits. 61.
- Phosphomonoesterase, Über den Einfluss der Electrolyten auf die — und Pyrophosphatase. 343.
- Phosphorstoffwechsel, Einfluss der Gallensäure auf den —. 1.
- Polypeptide, Konstitution der —

- und proteolytische Fermente. 163, 253.
- Potential d'oxydo-réduction, Sur le ——— de la rétine. 315.
- Potentiometric study, The ——— on the Schardinger reaction. 433.
- Protein, On the accuracy of some clinical methods of estimating the ——— present in the urine. 367.
- Proteolytische Fermente, Konstitution der Polypeptide und ———. 163, 253.
- Pyrophosphatase, Über den Einfluss der Electrolyten auf die Phosphomonoesterase und ———. 343.

R

- Rabbit, On the effect of insulin, epinephine and phlorhizin on the lactic acid content and the distribution of phosphates in the blood of ———s. 61.
- Reduktionsvermögen, Über die geschlechtlichen Unterschiede des Oxydations- und ———s in den Geweben des Hühnerembryos. 135.
- Reisembryo, Über die Sterine des ———s. 483.
- Rétine, Sur le potentiel d'oxydo-réduction de la ———. 315.
- Riesensalamanderei, Physikalische Eigenschaften der Perivitellinflüssigkeit des ———es. 407, 409, 413, 417, 419.
- Rivalta'sche reaktion, Beiträge zur ———n ———. 375.
- metric study on the ————. 433.
- Schwefelgehalt, Über den ——— des arteillen bzw. venösen Blutes des Pankreas. 423.
- Scurvy, Studies in experimental ———. 395.
- SHIBUYA, SHIGETOSHI. Über das Schicksal der Dehydrocholsäure im Hundeorganismus. 159.
- SHIBUYA, SHIGETOSHI. Über das Schicksal der Dehydrocholsäure im Krötenorganismus. 385.
- SHIBUYA, SHIGETOSHI u. TANAKA, TOSHIYUKI. Beiträge zur Kenntnis der Gallensäure aus der Fistelgalle des Kaninchens. 391.
- SHIMADA, JITSUICHI. Studies in experimental scurvy. XVI. The effect of irradiated narcotin on experimental scurvy. 395.
- Staub-Effect, Über die Beziehungen der alimentären Hypoglykämie, sowie des ———es zu verschiedenen Zuckerarten. 91.
- Stehriner, Über die ——— des Reisembryos. 483.
- Sugar, The action of ——— on amino acid. II. The reaction in the presence of oxidizing agents. 147.
- Synthalin-Hypoglykämie, Experimentelle Untersuchungen über die Verteilung der Kohlehydrate in den Organen und Geweben bei der Insulin- und ——— beim Hunger sowie bei Funktionsstörungen der Leber. 441.

T

- SAWADA, MASAO. Über die Beziehungen der alimentären Hypoglykämie, sowie des "Staub"-Effectes zu verschiedenen Zuckerarten. 91.
- Schardinger reaction, The potentio-
- TAKAHASHI, ICHIMATSU, KATAOKA, EISEL. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. VI. Über das Verhalten der Fettsubstanzen bei der Bebrütung des Riesensalamandereies. 419.

- TAKAHASHI, ICHIMATSU; YAMASAKI, FUJITO; ISEKI, TOSHINORI u. KUMON, TEKI. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. IV. Über das Verhalten der N-haltigen Verbindungen bei der Bebrütung des Riesensalamandereies. 413.
- TAKAHASHI, TAKEHIKO. A note on measuring methods of methylglyoxal. 299.
- TAKEUCHI, TADASHI. Über den Einfluss verschiedener organischer Verbindungen auf die Urease. 47.
- TANAKA, KEIZO. Keimdrüsenautolyse unter dem Einfluss der Gallensäure. 111.
- TANAKA, KEIZO. Über die Sterine des Reisembryos. 483.
- TANAKA, TOSHIYUKI u. SHIBUYA, SHIGETOSHI. Beiträge zur Kenntnis der Gallensäure aus der Fistelgalle des Kaninchens. 391.
- Thyreoparathyreoprive Hündin, Veränderungen im Kalkzustand durch Zufuhr von Gallensäure bei normaler sowie ——. 29.
- TOMITA, MASAJI u. FUJIWARA, HIDEKATSU. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. 401.
- TOYAMA, JUN-ICHI. A simple method for the isolation of xanthine oxidase from milk. 131.
- TOYAMA, JUN-ICHI. The potentiometric study on the Schardinger reaction. 433.
- TSUDJI, M. Vorbemerkung zu Durchblutungsversuchen des Magens. 259.
- TSUNOO, SHIGERU u. FUJIWARA, HIDEKATSU. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. II. Physikalische Eigenschaften der Perivitellinflüssigkeit des Riesensalamandereies. 407.
- TSUNOO, SHIGERU u. KATAOKA, EISEI. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. V. Über den Kohlehydratstoffwechsel bei der Bebrütung des Riesensalamandereies. 417.
- U**
- Urease, Über den Einfluss verschiedener organischer Verbindungen auf die ——. 47.
- Urine, On the accuracy of some clinical methods of estimating the protein present in the ——. 367.
- W**
- WATANABE, JÜKICHI. On muscle glyoxalase. 307.
- WATANABE, JÜKICHI. The action of sugar on amino acid. II. The reaction in the presence of oxidizing agents. 147.
- X**
- Xanthine oxidase, A simple method for the isolation of — from milk. 131.
- Y**
- YAMADA, SUSUMU. On the effect of insulin, epinephrine and phlorhizin on the lactic acid content and the distribution of phosphates in the blood of rabbits. 61.
- YAMASAKI, FUJITO, TAKAHASHI, ICHIMATSU; KUMON, TEKI; ISEKI, TOSHINORI. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. IV. Über das Verhalten der N-haltigen Verbindungen bei der Bebrütung des Riesensalamandereies. 413.
- YOSHIDA, Y. Durchblutungsversuchen

des Magens. (Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsudji) I. Mitteilung. Durchblutung des Magens mit Histamin. 261.

YOSHIO, KEIZO. Über den Einfluss der Ernährung auf die Wirkung des Adrenalins. 11.

YUUKI, HIDEO u. KURAMOTO, TSUNEO. Einfluss der Gallensäure auf den

Phosphorstoffwechsel (III). Blutphosphat bei Zufuhr von Cholsäure mit Adrenalin und vegetatives Nervensystem. 1.

Z

Zuckerarten, Über die Beziehungen der alimentären Hypoglykämie, sowie des "Staub"-Effectes zu verschiedenen —. 91.

